

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Christina Bachmannová**

Mikrobiální degradace výšemolekulárních polycyklických aromatických uhlovodíků  
Microbial degradation of high-molecular polycyclic aromatic hydrocarbons

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha 2018

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a vstřícnost, kterou mi při vypracování této bakalářské práce věnoval.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis

## Abstrakt

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou jedněmi z mnoha převážně antropogenních kontaminantů životního prostředí, které představují nebezpečí i pro lidské zdraví. Proto je potřeba získat co nejvíce poznatků o jejich degradaci a využít je v bioremediaci prostředí kontaminovaného těmito látkami. Zvláště polycyklické aromatické uhlovodíky s vyšší molekulovou hmotností jsou jen špatně rozpustné a tedy i málo biodostupné látky, z nichž benzo[*a*]pyren je prokázaný karcinogen a další byly shledány jako potenciální karcinogeny.

V této práci popisuji znalosti o mikrobiálních degradačních dráhách polycyklických aromatických uhlovodíků podezřelých z karcinogenních účinků na lidský organismus a to benzo[*a*]pyrenu, benz[*a*]anthracenu, dibenz[*a,h*]anthracenu, benzo[*k*]fluoroanthenu, benzo[*b*]fluoroanthenu, chrysenu a indeno[*1,2,3-c,d*]pyrenu. Dále rozebírám hydroxylující dioxygenázy, dihydrodiol dehydrogenázy a štěpící dioxygenázy, tedy první enzymy mikrobiálního katabolismu uhlovodíků a jejich přizpůsobení degradaci výšemolekulárních polycyklických aromatických uhlovodíků.

**Klíčová slova:** polycyklické aromatické uhlovodíky, *Pseudomonas*, biodegradation, benzo[*a*]pyren

## Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons are anthropogenic pollutants of the environment that represent danger to human health. Thus, there is a great need for knowledge of their degradation mechanisms that could be utilized for bioremediation of the contaminated environment. Polycyclic aromatic hydrocarbons with higher molecular weight are rather insoluble substances with very low bioavailability and one of them *i.e.* benzo[*a*]pyrene was found to cause carcinogenic effects and other polycyclic aromatic hydrocarbons are potential carcinogens.

In this thesis, I describe information of microbial degradation pathways of suspected carcinogens such as benzo[*a*]pyrene, benz[*a*]anthracene, dibenz[*a*]anthracene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*b*]fluoranthene, chrysene and indeno[1,2,3-*c,d*]pyrene. I also discuss enzymes of degradation pathways, namely ring-hydroxylating dioxygenases, dihydrodiol dehydrogenases, ring-cleaving dioxygenases and their adaptations to catabolism of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons.

**Key words:** polycyclic aromatic hydrocarbons, *Pseudomonas*, biodegradation, benzo[*a*]pyrene

## Seznam použitých zkratek

<b>ATSDR</b>	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
<b>BaA</b>	benz[ <i>a</i> ]anthracen
<b>BaP</b>	benzo[ <i>a</i> ]pyren
<b>BbF</b>	benzo[ <i>b</i> ]fluoranthen
<b>BkF</b>	benzo[ <i>k</i> ]fluoranthen
<b>C12O</b>	katechol 1,2-dioxygenáza
<b>C23O</b>	katechol 2,3-dioxygenáza
<b>CHD</b>	cyklus-hydroxylující dioxygenázy
<b>CHR</b>	chrysen
<b>CŠD</b>	cyklus-štěpící dioxygenázy
<b>DBA</b>	dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracen
<b>DD</b>	dihydrodiol dehydrogenázy
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>IcdP</b>	indeno[ <i>1,2,3-c,d</i> ]pyren
<b>PAU</b>	polycyklický aromatický uhlovodík
<b>US EPA</b>	U.S. Environmental Protection Agency
<b>VM</b>	výšemolekulární

## Obsah

1	Úvod .....	1
2	Polycyklické aromatické uhlovodíky .....	2
2.1	Zdroje PAU .....	2
2.2	Toxicita .....	3
3	Biodegradace .....	5
3.1	Fytodegradace, rhizosférická degradace .....	6
3.2	Degradace fotoautotrofními organismy .....	6
3.3	Fungální degradace .....	7
3.4	Bakteriální degradace .....	7
3.4.1	Anaerobní degradace .....	8
3.4.2	Aerobní degradace .....	9
4	Metabolické dráhy těžkých PAU .....	11
4.1	Benzo[ <i>a</i> ]pyren .....	11
4.2	Benz[ <i>a</i> ]anthracen .....	13
4.3	Chrysen .....	14
4.4	Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthen a benzo[ <i>k</i> ]fluoranthen .....	15
4.5	Indeno[ <i>1,2,3-c,d</i> ]pyren .....	17
4.6	Dibenz[ <i>a,h</i> ]anthracen .....	17
5	Enzymy .....	17
5.1	Cyklus-hydroxylující dioxygenázy .....	17
5.1.1	Struktura $\alpha$ a $\beta$ podjednotky .....	18
5.1.2	Specifita aktivního místa .....	19
5.2	Dihydrodiolové dehydrogenázy .....	22
5.3	Cyklus-štěpící dioxygenázy .....	22
6	Závěr .....	23
7	Použitá literatura .....	25

# 1 Úvod

Relativně nedávné znečištění půdy, vod i vzduchu množstvím toxických látek narušilo dosavadní přírodní procesy. Jednou skupinou z těchto kontaminantů jsou polycyklické aromatické uhlovodíky vznikající nedokonalým spalováním organické hmoty a jejichž rozšíření je hrozbou pro ekosystémy i lidské zdraví. Toxicita těchto látek pro živé organismy se odvíjí od jejich lipofilního charakteru, mutagenních a karcinogenních vlastností.

Jako jiné organické kontaminanty, i PAU podléhají degradaci, ať už abiotické-fyzikální či chemické nebo biodegradaci organismy. Co se týče biodegradací, PAU mohou být odstraněny různými organismy, akumulovány v rostlinách nebo degradovány řasami, houbami či bakteriemi. Významný potenciál v tomto směru poskytují bakterie díky pestrosti metabolismů a schopnosti degradovat i PAU o více cyklech.

Právě tyto VM PAU jsou nejproblematičtějšími kontaminanty, jde o velmi hydrofobní látky jen málo rozpustné ve vodě a tak velmi špatně dostupné pro degradace organismy. Sedm z těchto látek mělo dle US EPA karcinogenní efekty na zvířata, mohou tedy představovat hrozbu i pro lidi. Mezi nimi jsou CHR, BaA, BkF, BbF, DBA a IcdP. Známým karcinogenem je také BaP.

Ačkoliv degradace lehkých PAU je za několik desetiletí jejich výzkumu velmi dobře prostudována, informace o degradaci těžkých PAU, zvláště těchto sedmi karcinogenů jsou spíše vzácné. Výjimkou je BaP, jehož katabolismus je poměrně dobře probádán, v posledních letech byla také v několika pracích věnována pozornost BaA.

Kromě objasnění drah katabolismu PAU jsou pro jejich remediaci nutné poznatky o bakteriích schopných jejich rozkladu a podrobnější výzkum enzymů zvláště horních částí drah metabolismu. Těmito enzymy jsou CHD, DD a CŠD. Prvním enzymem určujícím degradaci kontaminantu jsou CHD. Jejich studiem se zabývalo již mnoho prací, ale jen malý podíl z nich odhalil krystalovou strukturu dioxygenáz hydroxylujících těžké PAU. Přitom porozumění závislosti struktury enzymu bakterie na schopnosti přeměňovat substrát je klíčové pro rozvíjení bioremediačních technologií a tak odlehčení životnímu prostředí od těchto látek. Zároveň obecné informace o biodegradacích antropogenních kontaminantů jsou důležité z hlediska samočisticích schopností prostředí a introdukce nových organických látek do životního prostředí a jejich potencionálním osudu.

## 2 Polycyklické aromatické uhlovodíky

PAU představují sloučeniny skládající se pouze z atomů uhlíku a vodíku. Nejmenšími PAU jsou anthracen a fenanthren, někdy touto zkratkou bývá označován i naftalen, ačkoliv se jedná o bicyklický, nikoliv polycyklický aromatický uhlovodík.

Jsou to bílé či světle žlutě zbarvené lipofilní nepolární látky s vysokými body tání i varu, lišícími se dle počtu cyklů. V pevné formě se nacházejí PAU s více cykly, kdežto PAU o méně než třech cyklech těkají do ovzduší a ve vodě jsou lépe rozpustné. Každý polycyklický aromatický uhlovodík má jiné UV absorpční spektrum, což značně usnadňuje identifikaci PAU.

### 2.1 Zdroje PAU

Zdrojem těchto látek je především nedokonalé spalování organického materiálu při nízkých koncentracích kyslíku, k němuž může dojít při lesních požárech, sopečných erupcích, ale především antropogenními aktivitami. Lidská činnost, kterou provází vznik PAU čítá například získávání uhelného koksu, dehtu, krakování ropy nebo spalování dřeva pro vytápění staveb. Obrovským zdrojem je také spalování pohonných hmot. Z menší části PAU vznikají jako meziprodukty farmaceutického a chemického průmyslu.

Distribuce v prostředí odpovídá charakteru sloučeniny. Jak již bylo zmíněno, lehké PAU jsou lépe rozpustné ve vodě a mohou se vyskytovat v plynném stavu, což značně usnadňuje jejich rozšíření i do míst velmi vzdálených od zdroje. Naopak těžké PAU o pěti a více cyklech bývají vázány na prachové částice, dále se usazují do půd a sedimentů. Vzhledem k povaze zdrojů těchto látek lze očekávat jejich nejvyšší koncentrace v městech a jejich okolí, podél silnic, blízko uhelných elektráren, na skládkách a podobně.

Peng a kolektiv měřili koncentraci ve venkovských oblastech vzdálených několik desítek kilometrů od Pekingu, kde se koncentrace PAU v půdě pohybovaly mezi 29-200  $\mu\text{g/kg}$ . V centru Pekingu ale koncentrace vyšplhaly až k 13  $\text{mg/kg}$  (Peng *et al.*, 2016). Sedimenty v mexickém městě Tijuana podél silnic obsahovaly průměrně 933  $\mu\text{g/kg}$  (Garcia-Flores *et al.*, 2016). V půdách pastvin přilehlých francouzským silnicím se kontaminace PAU pohybovala mezi 767 až 3989  $\mu\text{g}$  na kilogram suché půdy, koncentrace BaP a BaA v řádech desítek  $\mu\text{g/kg}$  (Crépineau *et al.*, 2003). Lehké PAU vznikají spíše lesními či stepními požáry a pálením dřeva, takže je nalézáme více v přírodě, i když ne v poměru, který bychom čekali, protože podléhají degradaci daleko rychleji než těžké PAU (Vane *et al.*, 2013).

Ovšem i na člověkem nejméně dotčených místech jako některé části Antarktidy, byly PAU nalezeny ve sněhu v koncentracích 26-197  $\text{ng/l}$  (Kukučka *et al.*, 2010). V pevném stavu jsou



těžké PAU méně biodostupné a tedy podléhají degradaci daleko méně než lehké PAU, čímž dochází k jejich přetrvávání a akumulaci v prostředí. Navíc se díky své lipofilní povaze dostávají skrz stěny trávicího traktu živočichů a mají tendenci se ukládat v tukových tkáních.

## 2.2 Toxicita

Jako první vyslovil domněnku spojitosti PAU a škodlivých efektů chirurg Percival Pott v roce 1775. Pozoroval rakovinu šourku u kominíků, kteří jsou během svého povolání opakovaně vystaveni přítomnosti sazí. Toto pozorování bylo asi o století později následováno dalšími objevy různých případů, například vyššího počtu pacientů s rakovinou kůže mezi horníky než mezi běžnou populací (Azike *et al.*, 2009). V průběhu 20. století postupně došlo k rozšiřování znalostí o produktech nedokonalého spalování, byly provedeny pokusy na zvířatech, které dokázaly souvislost mezi expozicí zvířete dehtu a následnými nádory. O několik let později došlo k identifikaci karcinogenních sloučenin (Yamagiwa *et al.*, 1917).

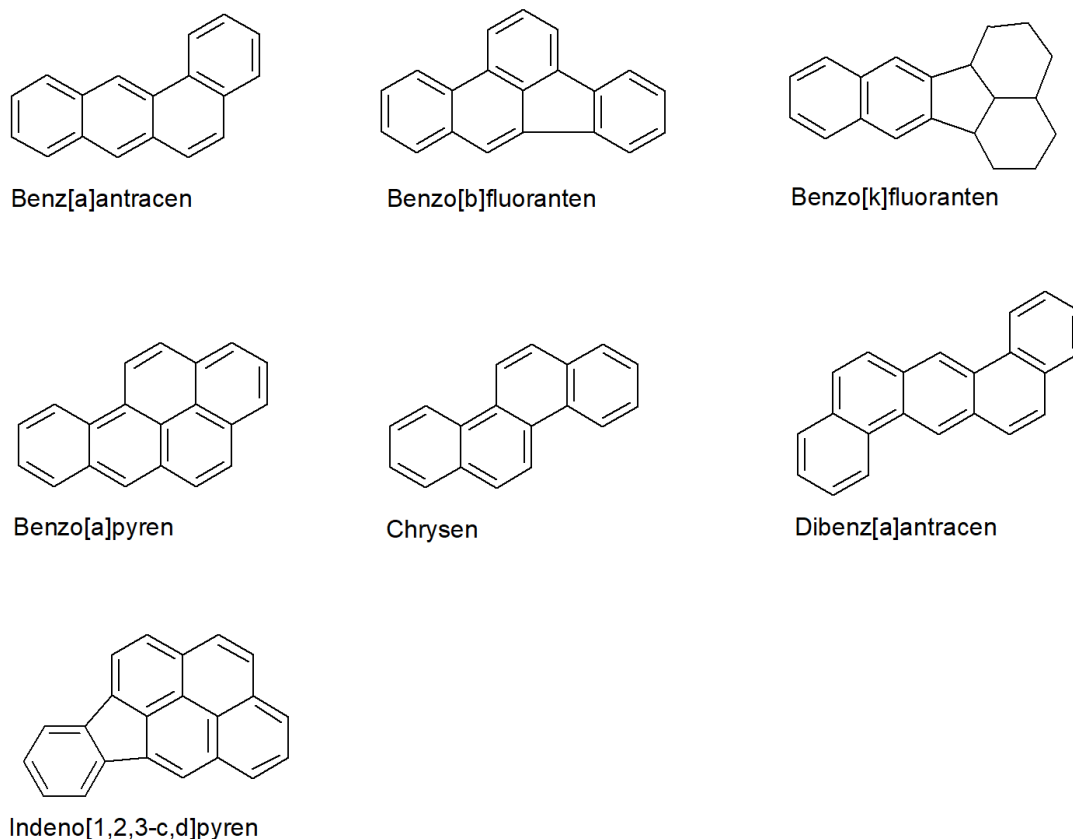
Jak již bylo uvedeno, PAU jsou prakticky všudypřítomné, vyskytují se ve vzduchu, půdě i vodním prostředí. Ve vzdálenějších oblastech od lidských sídel v nízkých neškodných koncentracích, avšak v okolí městských a průmyslových oblastí mohou jejich vysoké koncentrace ovlivňovat ekosystémy. Zatím nebyl prokázán škodlivý vliv běžné koncentrace PAU na suchozemské bezobratlé živočichy, savce nebo rostliny, tyto efekty se dostávají až když je půda vysoce kontaminovaná. Vodní ekosystémy jsou však na obsah těchto látek ve vodě citlivější a vodní živočichové mají často tendenci je akumulovat (Ikenaka *et al.*, 2013). Dále v mořích a oceánech jsou koncentrace PAU v řádech desetin nanogramů na litr zanedbatelné a nemají žádný efekt na okolní organismy (Maldonado *et al.*, 1999). V zátokách v okolí průmyslových oblastí či řekách protékajících městy mohou koncentrace dosahovat 10 µg/l a způsobit akutní toxicitu (Zhou *et al.*, 2003). Takové hodnoty jsou škodlivé nejen pro vodní organismy, ale i pro jejich konzumenty vzhledem ke zmíněné zvýšené schopnosti některých ryb a měkkýšů akumulovat PAU. Zvláště mlži filtrují velké objemy vody a PAU eliminují z těl jen pomalu (Doong *et al.*, 2004).

Až na podobné případy se však PAU v syrové lidské stravě vyskytují zřídka, dále záleží na přípravě potravin. Koncentrace PAU v grilovaném mase může dosáhnout i 320 µg/kg, uzené a pečené o něco méně (210 a 130 µg/kg), nejméně vařené, připravené v páře apod. (Chen *et al.*, 1997).

Požítí těchto látek může být jednou z možných vstupních cest do organismu, další nejčastější je dýchání kontaminovaného vzduchu nebo kožní kontakt. Dle možných způsobů kontaktu organismu s PAU se liší i akutní efekty, může se jednat o dýchací obtíže, podráždění očí, kůže,

malátnost či zvracení. Dlouhodobá expozice PAU s sebou nese zvýšené riziko rakoviny kůže, plic, močového měchýře nebo střev (Kim *et al.*, 2013).

Z této rozsáhlé skupiny látek jich bylo několik shledáno potenciálně zdraví škodlivými a jejich výskyt je regulován různými světovými organizacemi, například International Agency for Research on Cancer (IARC), Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) nebo U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). Některé PAU jsou klasifikovány US EPA jako karcinogeny zvířat, mezi nimi jsou BaP, CHR, BaA, BkF a BbF, DBA a IcdP, viz Obrázek 1 (Rengarajan *et al.*, 2015).



**Obrázek 1: Vzorce karcinogenů jejichž efekt byl prokázán na zvířatech.** Upraveno dle Mugica *et al.*, 2010.

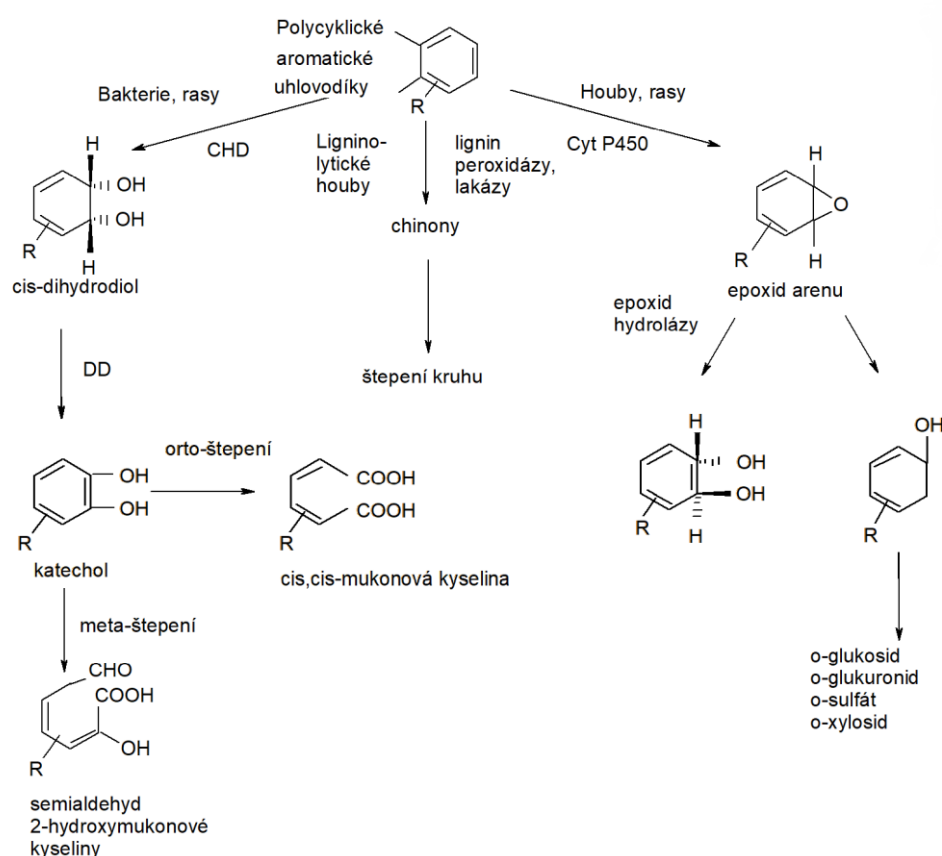
Jak vyplývá ze způsobu jejich vzniku, PAU se nevyskytují jako jednotlivé látky nýbrž jako směsi. Bylo prokázáno, že směsi podléhají metabolismu odlišnému od metabolismu jednotlivých PAU, dochází k enzymové kompetici a dalším efektům (Desai *et al.*, 2008).

Lipofilicita těchto sloučenin zapříčiňuje jejich vyšší biodostupnost po požití či inhalaci, dále se ukládají v orgánech s bohatým obsahem tukové tkáně, ze kterých pak mohou být uvolňovány. Po vstupu do organismu podléhají metabolické aktivaci specifickými enzymy.

První reakcí je epoxidace, následně dochází ke konjugaci s glutathionem, konverzi na fenoly a dioly. Ani takovéto metabolity nemusí být dostatečně polární, aby byly exkretovány, proto musí být konjugovány s glukuronovou nebo sírovou kyselinou a následně mohou být vyloučeny z těla (Campo *et al.*, 2010)

### 3 Biodegradace

Ať se jedná o degradaci kontaminantů rostlinami, řasami, houbami, bakteriemi či kombinacemi organismů, metoda bioremediace, při které se biodegradace využívá, se jeví jako environmentálně nejšetrnější variantou. Při této metodě je obecně spotřebováno méně chemikálií a energie než při chemické či fyzikálních metodách zahrnujících například UV oxidaci, fixaci, spalování nebo extrakci rozpouštědlem (Korfmacher *et al.*, 1980; Moursy *et al.*, 1983). V principu se jedná o rozklad organických sloučenin aerobně na vodu a oxid uhličitý, anaerobně na methan. Základní princip drah degradace řasami, houbami i bakteriemi je znázorněn v Obrázek 2.



**Obrázek 2: Schéma degradace PAU řasami, houbami a bakteriemi.** Upraveno dle Cerniglia *et al.*, 1993.

### 3.1 Fytodegradace, rhizosférická degradace

Ačkoliv rostliny mohou být na kontaminanty velmi citlivé zvláště při vyšších koncentracích, remediaci PAU značně urychlují. Například jetel či brukev odstranily po 70 dnech až 41,46 % z původních desítek až stovek miligramů na kilogram fenantrenu v půdě. S o několik procent menší účinností degradovaly i pyren. Při výsadbě více odlišných rostlin se množství odstraněných PAU ještě zvýšilo. Navíc při společné výsadbě docházelo k nižší akumulaci kontaminantů rostlinami než-li při samostatné (Wei *et al.*, 2010).

Samotné rostliny nemají dráhy vedoucí ke kompletní mineralizaci složitých organických molekul jako PAU, jsou je ale schopné transformovat na další metabolity nebo je akumulovat do různých tělních orgánů, především do kořenové epidermis (Alagić *et al.*, 2015). Jako vhodnější metoda se tedy jeví rhizoremediace.

Rostlina při rhizoremediaci svým kořenovým systémem vytváří vhodné prostředí pro bakterie a houby, které jsou schopné PAU degradovat. Některé rostliny mohou vylučovat látky zvyšující povrchové napětí až do té míry, kdy se stanou kontaminanty rozpustnými a jsou tak dostupné pro další degradaci (Desai *et al.*, 1997). Jiné rostliny vylučují z kořenů do prostředí enzymy jako peroxidázy, katalázy nebo lakázy, které mohou transformovat PAU (Dorantes *et al.*, 2012).

Rhizoremediace se jeví jako účinnější metoda než fytořezem i do míry, kdy z desítek miligramů na kilogram lehkých i těžkých PAU zbyly desetinné či nedetekovatelné hodnoty. To už po třech měsících rhizoremediace kořínky s bakteriemi *Bacillus licheniformis* a *Bacillus mojavensis*. s výjimkou BaP, jehož koncentrace se snížila dvojnásobně (Eskandary *et al.*, 2017).

Častá schopnost akumulace kontaminantů rostlinami je nevýhodou této metody, v půdě může být sloučenina v mnohokrát nižším množství, ale po spasení rostliny zvěří se opět může vracet potravním řetězcem do ekosystému.

### 3.2 Degradace fotoautotrofními organismy

Jelikož mikroskopické řasy a sinice jsou významnými primárními producenty vodních ekosystémů, je třeba brát v potaz i jejich degradační schopnosti. Sinice *Oscillatoria sp.* oxiduje naftalen při fotoautotrofních růstových podmínkách na 1-naftol. Jiná mořská sinice *Agmenellum quadruplicatum* degradoval fenantren na fenantren *trans*-9,10-dihydrodiol a 1-methoxyfenantren (Cerniglia *et al.*, 1980; Narro *et al.*, 1992). Řasa *Selenastrum capricornutum* oxiduje BaP na *cis* benzo(a)pyren-dihydrodioly za pomoci dioxygenázového systému, který je podobný bakteriálnímu systému užívanému při degradaci PAU (Warshawsky *et al.*, 1988). Tato

řasa je také schopná odstranit 99 % BaP z původních 266 µg/l v tekutém médiu již po 15 hodinách expozice, je ovšem nutné opět zdůraznit, že v tomto procesu převládá bioakumulace nad degradací, která trvá mnohem déle. (García de Llasera *et al.*, 2016).

### 3.3 Fungální degradace

Většina hub neumí užívat PAU jako jediný zdroj uhlíku, dochází tedy ke kometabolizaci PAU za pomoci monooxygenázových enzymů (Durairaj *et al.*, 2016). Z hlediska schopnosti rozkládat PAU se dělí houby do dvou skupin, ligninolytické a neligninolytické vláknité houby. První typ rozkládá peroxidázami a lakázami přes chinony a kyseliny, druhé produkují enzymy z rodiny cytochromu P450 monooxygenáz a mohou tvořit dihydrodioly, často toxičtější než původní PAU (Marco-Urrea *et al.*, 2015).

Ligninolytické houby extracelulárně sekretují peroxidázy a lakázy, na rozdíl od intracelulární sekrece enzymů bakteriemi, a mohou tak zpřístupňovat PAU dalšímu metabolismu (Tortella *et al.*, 2005). Na druhou stranu je nutné podotknout, že půda není přirozený habitat pro ligninolytické houby, proto se rovněž studují neligninolytické vláknité houby (Andersson *et al.*, 1996). V práci Clemente a kolektiv studoval několik ligninolytických kmenů, jeden z nich vykazoval po 12 dnech degradaci 69 % původních 300 µl 5% naftalenu, další degradoval 65 % z 3 ml 0,5% anthracenu (Clemente *et al.*, 2001).

Neligninolytické houby degradují PAU přes metabolity podobné těm produkovaným savčími enzymy. Prvním krokem jejich metabolismu je tvorba *trans*-dihydrodiolů enzymem cytochrom P450 monooxygenázou. Ligninolytické houby jsou schopny degradovat i vysoké koncentrace PAU, bylo prokázáno více jak 50% odstranění fluoranthenu pomocí *Pleurotus ostreatus* z koncentrace 70 mg/l během 12 dní, houby je tedy možné použít i ve velmi kontaminovaných prostředích (Patel *et al.*, 2009).

### 3.4 Bakteriální degradace

Bakterie se objevily již před více než třemi miliardami let a za tuto dobu si vyvinuly strategie pro získávání energie prakticky z jakékoliv sloučeniny. Jde o nejpočetnější mikrobiální skupinu schopnou degradovat polycyklické aromatické uhlovodíky, neexistuje však jediný druh, který by metabolizoval všechny PAU. Nejúčinnější degradace směsí PAU jsou tedy prováděny různorodými aerobními i anaerobními bakteriálními komunitami.

První nejrozsáhlejší degradační potenciál byl objeven u aerobní Gram-negativní bakterie rodu *Pseudomonas* s ohromnou pestrostí metabolismů. Dále došlo k objevu velké různorodosti metabolismů i u rodů *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Novosphingobium* nebo *Agrobacterium*.

Romero a kolektiv izolovali ze silně kontaminovaného potoka kmen bakterie *Pseudomonas* schopný téměř kompletní degradace fenanthrenu (Romero *et al.*, 1998). Co se týče degradace uhlovodíků o čtyřech a více cyklech, Das a kolektiv izolovali bakterii *Pseudomonas aeruginosa* schopnou užívat pyren jako jediný zdroj uhlíku. Tento izolát metabolizoval 60 % původního množství 0,5 mg/ml pyrenu během 8 dní (Das *et al.*, 2007).

Co se týče transportu sloučenin do buněk, bakterie nejspíš nepřijímají PAU aktivně, přes specializované transportní systémy, ale prostou difuzí přes buněčnou stěnu a membránu, což je umožněné malou velikostí a lipofilicitou těchto kontaminantů. Ačkoliv Miyata a kolektiv naznačují opak, existence takových systémů nebyla ověřena molekulárními metodami (Miyata *et al.*, 2004).

Kvůli tomuto typu transportu platí, že čím je látka v prostředí koncentrovanější a biodostupnější, tím rychlejší je její příjem. Takto mohou bakterie docílit rychlé degradace PAU, ale u těch více toxických může dojít k akumulaci v buňce a případně buněčné smrti (Sikkema *et al.*, 1995).

### 3.4.1 Anaerobní degradace

Biodegradace PAU mikrobiálními komunitami v sedimentech kontaminovanými PAU byla pozorována za aerobních i anaerobních podmínek. Mnoho prostředí kontaminovaných PAU je anoxických, anaerobní organismy tak hrají velmi důležitou roli ve fungování těchto ekosystémů, ale i přesto se anaerobní degradací zabývá poměrně málo studií ve srovnání s degradací aerobní.

Při anaerobní degradaci dochází k zisku energie oxidací aromatických sloučenin a k redukci různých akceptorů elektronů jako sulfáty,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  a podobně. Energetické zisky z těchto oxidací nejsou příliš vysoké a vedou k dobám zdvojení dlouhých i týdny a měsíce (Meckenstock *et al.*, 2011).

Byla pozorována anaerobní degradace PAU jako jediného zdroje jak uhlíku tak energie (Selesi *et al.*, 2009). Ale i PAU o více cyklech za redukce sulfátu (Rothermich *et al.*, 2002). Quin a kolektiv pozorovali schopnost bakterie rodu *Microbacterium* degradovat BaP jako jediný zdroj uhlíku za denitrifikačních podmínek a zároveň navrhli možnou dráhu tohoto procesu (Qin *et al.*, 2017).

Ačkoliv se anaerobní metabolismus jednotlivých PAU a jednotlivých bakterií liší, lze sjednotit dráhy nesubstitovaných PAU, které bývají aktivovány karboxylací. Naopak substituované PAU jsou nejčastěji aktivovány adicí fumarátu a do dalšího metabolismu posléze vstupují  $\beta$ -oxidací (Annweiler *et al.*, 2000; Bergmann *et al.*, 2011). Chang a kolektiv pozorovali degradaci 80-100 % fenanthrenu, acenaftenu, anthracenu, fluorenu a pyrenu z původních 2  $\mu$ g na gram půdy po 90 dnech inkubace s konzorciem bakterií za několika různých anaerobních podmínek - sulfát-reduktivní, metanogenní a nitrát-reduktivní podmínky (Chang *et al.*, 2002).

### 3.4.2 Aerobní degradace

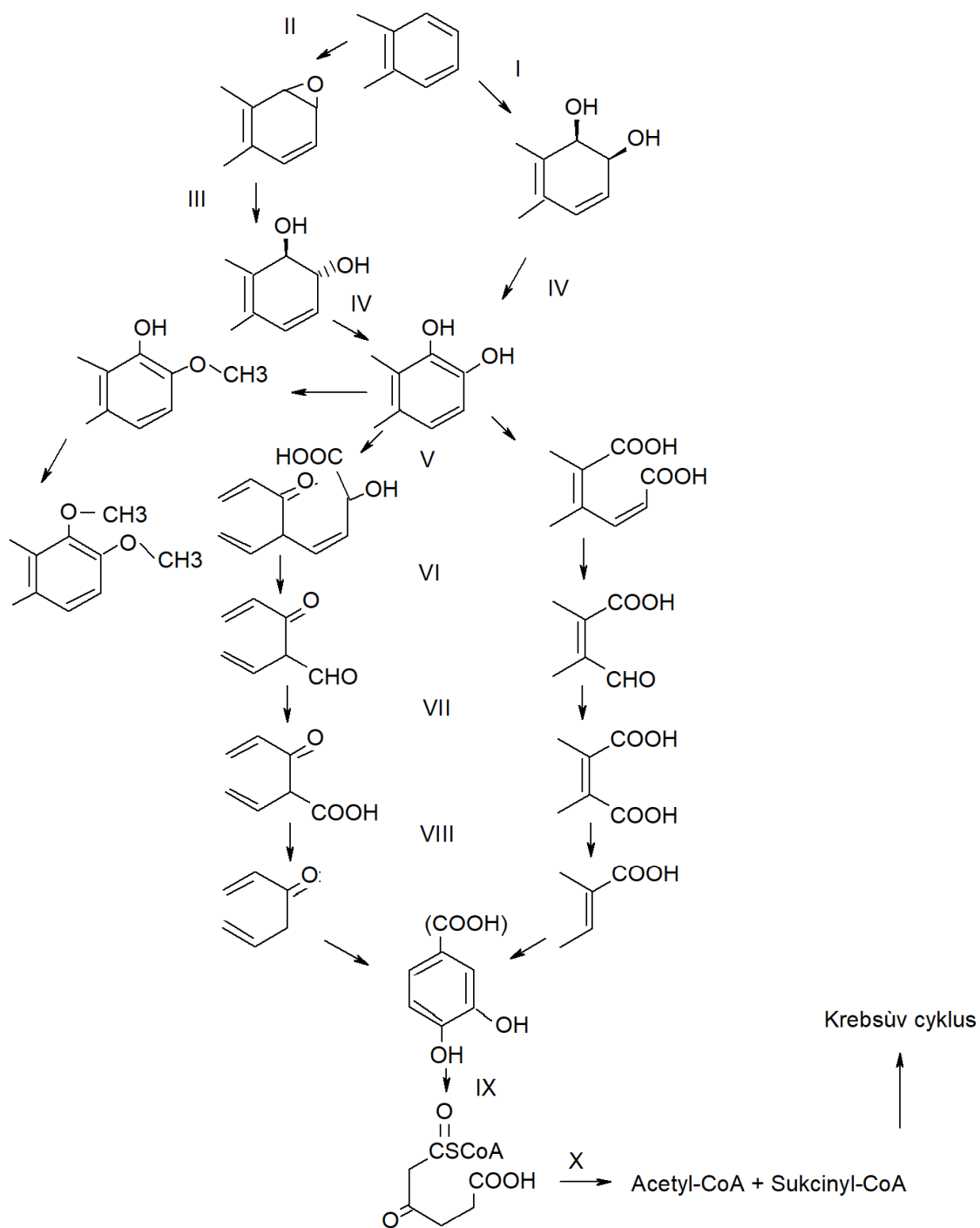
Aerobní podmínky poskytují vyjma dalších látek i kyslík, který bakterie využívají nejen jako akceptor elektronů, ale i pro klíčové katabolické procesy. Aerobní metabolismus nabízí vyšší zisky energie a je bakteriemi preferován.

Během katabolismu PAU (viz Obrázek 3) dioxygenázové hydroxylující enzymy (I) hydroxylují aromatické kruhy a tvoří tak *cis*-dihydrodioly. Následně jsou tyto intermediáty oxidovány dihydrodiolovými dehydrogenázami (IV) na dihydroxy sloučeniny a štěpeny cyklus-štěpící dioxygenázami (V). Inkorporace dvou kyslíkových atomů do dihydroxy derivátu PAU je provázena štěpením cyklu v orto nebo meta poloze. Orto-štěpení, nebo-li intradiolové štěpení, je mezi uhlíky nesoucími hydroxy skupiny a jeho výsledkem je dikarboxylová aromatická kyselina. Meta-štěpení (extradiolové) je mezi jinými uhlíky a vzniká při něm monokarboxylová aromatická kyselina, nejčastěji s aromatickými substituenty 2-ketobutenové kyseliny. Kromě následného štěpení kruhu může být dihydroxy-sloučenina metylována katechol *o*-metyltransferázou (XI).

Produkt je štěpen v aldolázové reakci (VI), transformován aldehyd dehydrogenázami (VII), dekarboxylován (VIII), nadále podléhá reakcím katalyzovaných řadou dalších enzymů (IX), aby byl štěpen  $\beta$ -ketoadipyl-CoA thiolázami na acetyl-CoA a sukcinyl-CoA (X). Tyto produkty vstupují do Krebsova cyklu, odkud mohou intermediáty vstupovat do dalších metabolismů a tvořit základní stavební kameny buňky (Das *et al.*, 2011).

Druhá možná dráha bakteriální aerobní degradace začíná monooxygenací cytochromem P450 monooxygenázami (II) na epoxid, který je posléze transformován příslušnou epoxid-hydrolázou (III) na *trans*-dihydrodiol.

Pro většinu těžkých PAU existuje vícero drah degradace, které se stýkají v centrálních metabolických intermediátech podléhajícím dalšímu rozkladu. Po odbourání několika cyklů tedy vstupují do metabolismu lehkých PAU.



**Obrázek 3: Aerobní bakteriální degradace PAU.** Upraveno dle Kim *et al.*, 2008.



## 4 Metabolické dráhy těžkých PAU

### 4.1 Benzo[a]pyren

Jednou z nejvíce prozkoumaných drah mikrobiální degradace PAU je právě dráha BaP a to kvůli jeho karcinogenním vlastnostem. Ačkoliv se jedná o pěticyklý uhlovodík, je zkoumán daleko častěji než většina čtyřcyklých aromatických uhlovodíků, které podléhají rozkladu snáze. Zatím však neexistuje žádná práce, která by dokázala růst bakterií pouze na BaP bez předchozí indukce exprese degradačních enzymů jinými PAU.

Prvním případem degradace BaP byla oxidace na dihydrodioly *Sphingomonas yanoikuyae* (Gibson *et al.*, 1975). Produkty štěpení cyklu se podařilo odhalit až v roce 1996 (Schneider *et al.*, 1996). Detekovali *cis*-7,8-dihydrodiol a produkty dioxygenázového ataku na pozici 7,8- a 9,10-. Navrhli také, že *Mycobacterium sp.* RJDII-135 by mohla atakovat BaP na pozicích 4,5-, 7,8- a 9,10-.

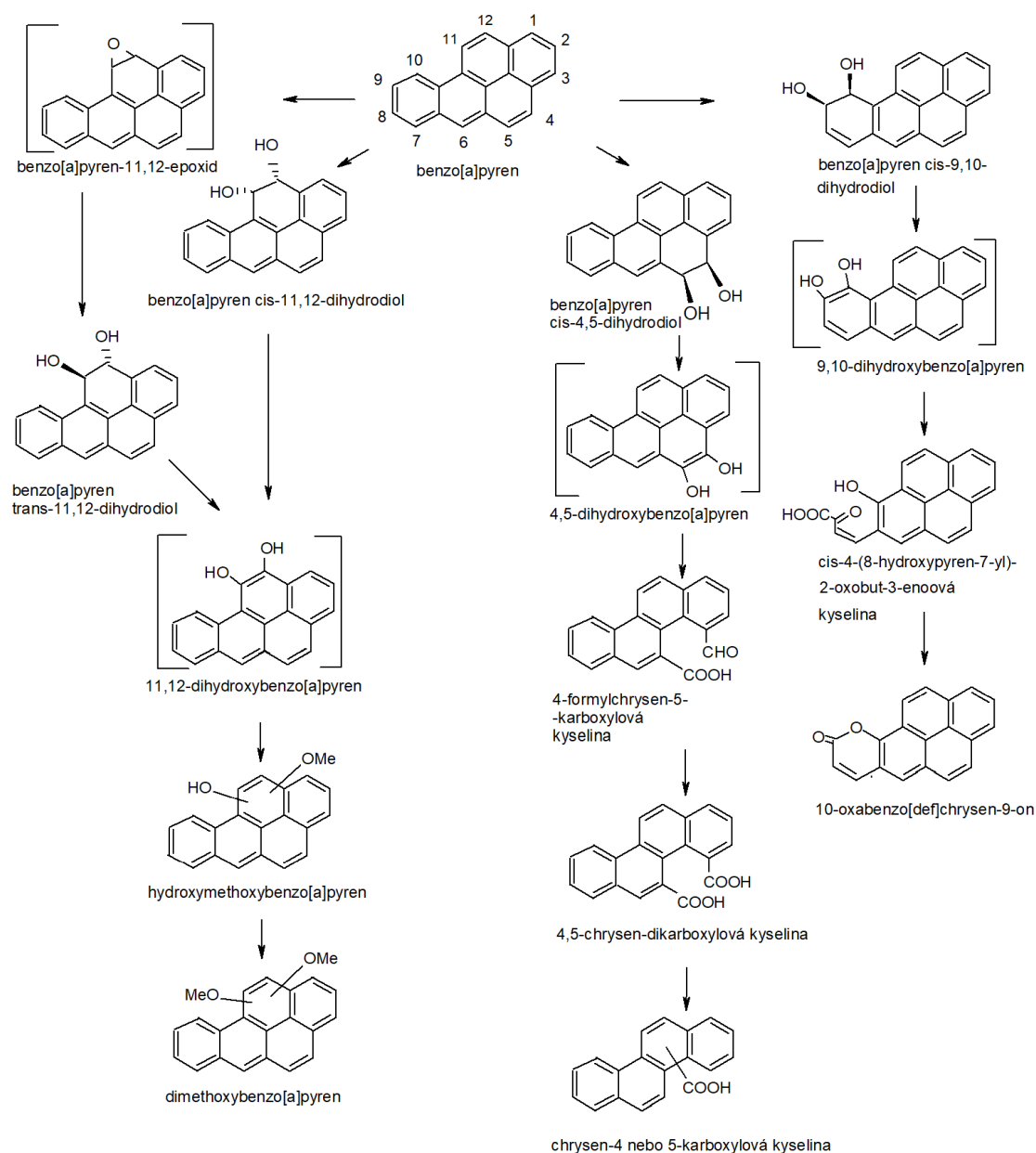
Jednou z prvních odhalených bakterií se schopností do vysoké míry degradovat BaP a i další těžké PAU byla *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1. Moody a kolektiv doplnili tehdejší poznatky o degradačních dráhách BaP o 11,12- dráhu prováděnou dioxygenázou PhnI a monooxygenázami, schéma této dráhy i dalších je prezentováno v Obrázek 4 (Moody *et al.*, 2004). Monooxygenázy zapříčiňují vznik benzo[a]pyren-11,12-epoxidu, který je následně epoxid hydrolázami na *trans*-benzo(a)pyren-11,12-dihydrodiol. Dioxygenázy oxidují BaP za vzniku *cis*-11,12-dihydrodiolu. Obě tyto dráhy se spojují transformací na 11,12-dihydroxybenzo[a]pyren, ten je metylován na hydroxymethoxybenzo[a]pyren a posléze dimethoxybenzo[a]pyren.

Monooxygenace BaP je pravděpodobně prováděna cytochromy P450, neboť tři geny kódující cytochrom P450 a epoxidové hydrolázy byly detekovány v *M. vanbaalenii* PYR-1 společně s geny pro dioxygenázy (Brezna *et al.*, 2006).

Degradace BaP na chrysen-4 nebo 5-karboxylovou kyselinu probíhá atakem na 4,5- pozici za vzniku *cis*-benzo[a]pyren-4,5-dihydrodiolu a po obnovení cyklu 4,5-dihydroxybenzo[a]pyren. Následně dochází k orto-štěpení za vzniku 4-formylchrysen-5-karboxylové kyseliny, po další oxidaci 4,5-chrysen-dikarboxylová kyselina, reakce ústí v chrysen-4(5)-karboxylové kyseliny.

Další možností je atak na pozici 9,10-, které ústí v derivát pyrenu. Benzo[a]pyren *cis*-9,10-dihydrodiol, rearomatizován na 9,10-dihydroxybenzo[a]pyren je degradován štěpením v meta poloze na *cis*-4-(8-hydroxypyren-7-yl)-2-oxobut-3-enovou kyselinu a dál na 10-oxabenzo[def]chrysen-9-on.

BaP je degradován i dalšími bakteriemi, například *Novosphingobium pentaromativorans* nebo *Pseudomonas sp.* z Jiaozhou Bay, které byly schopny odstranit BaP více jak ze 70 % během 40 dní z původních 40 mg/l (Jin *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2012). Rentz a kolektiv dokonce identifikovali metabolity *S. yanoikuyae* rostoucí na BaP a podpořili tak návrh dráhy Moodyho a kolektivu vycházející z ataku na pozicích 9,10-. Dále identifikovali metabolit vycházející z ataku na pozici 7,8-, čímž podporují zjištění Schneidera a kolektivu (Rentz *et al.*, 2008). Také potvrdili, že tato bakterie nehromadí toxické deriváty tvořené oxidací BaP, naopak dochází k dalšímu rozkladu těchto metabolitů.



**Obrázek 4: Dráhy katabolismu benzo[a]pyrenu.** Zde jsou vyobrazeny možnosti degradace BaP *M. vanbaalenii* PYR-1, sloučeniny v závorkách znázorňují navržené, nikoliv detekované intermediáty. Upraveno dle Moody *et al.*, 2004.

## 4.2 Benz[a]anthracen

Společně s dalšími několika PAU: CHR, BkF a BbF je BaA podezřelý z karcinogenity. Respektive až jeho produkty metabolicky aktivované cytochromem P450 monooxygenázami a hydrolázami mohou představovat nebezpečí. Tímto produktem je *trans*-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxid se schopností vázat se na DNA (Braithwaite *et al.*, 1998).

V kontaminovaných půdách a sedimentech může být BaA částečně degradován *Mycobacterium sp.* S65 a bakteriemi z jiných skupin, například *Sphingomonas sp.* LH128 a dalšími bakteriemi rodů *Sphingobium* nebo *Pseudomonas* (Boyd *et al.*, 2006; S. Chen *et al.*, 1999; Sho *et al.*, 2004; Schuler *et al.*, 2009).

Prvními známými metabolity BaA byly *cis*-1,2-, -8,9- a -10,11-dihydrodioly formované *S. yanoikuyae* B8/36. Dalšími bakteriemi u nichž byly nalezeny produkty dioxygenace a to konkrétně benz[a]anthracen *cis*-5,6-dihydrodiol, byly *Mycobacterium sp.* RJGII-35 (D. T. Gibson, 1999). Až Moody a kolektiv objasnili čtyři dráhy degradace BaA *M. vanbaalenii* PYR-1 viz Obrázek 5 (Moody *et al.*, 2005).

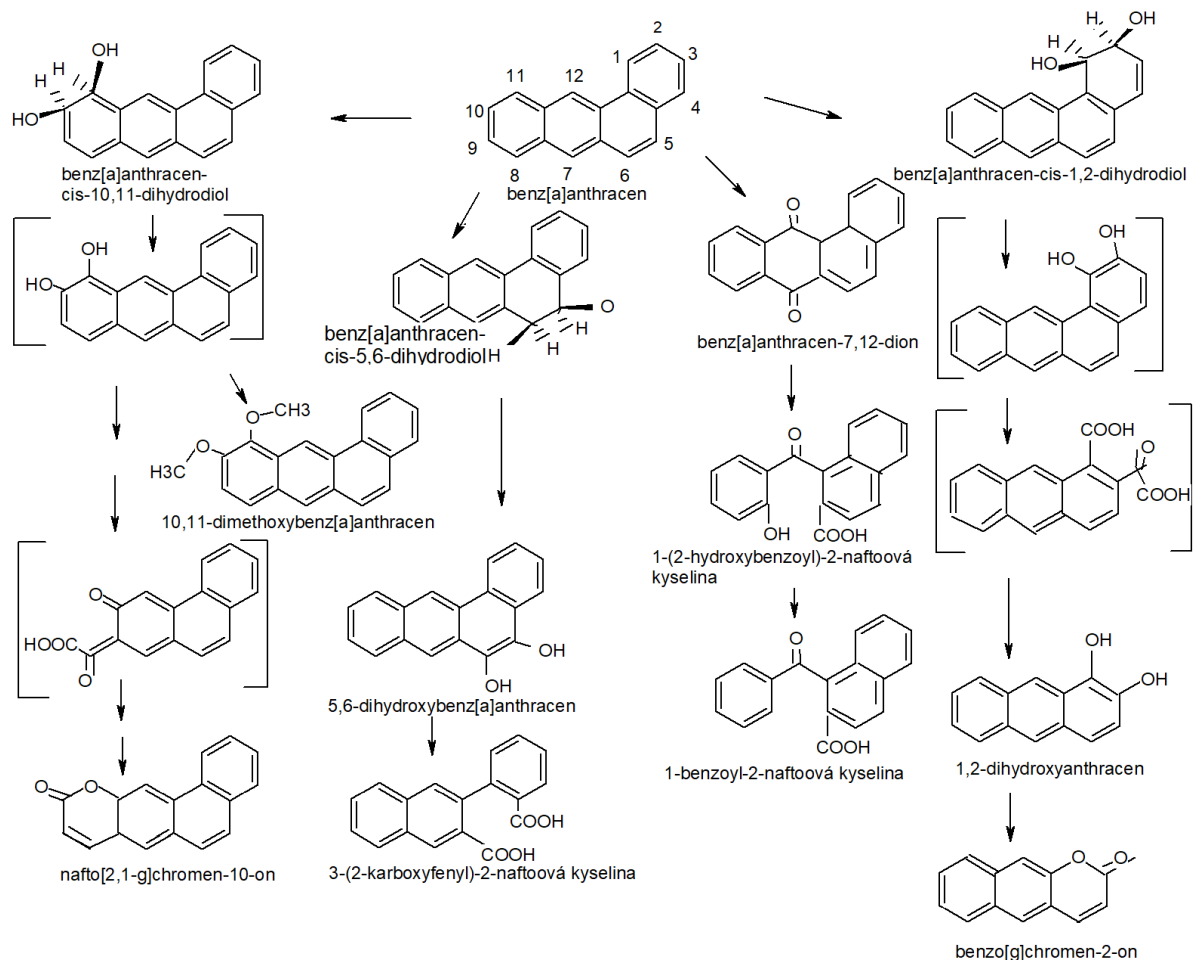
Kromě dominantního místa ataku na pozici 10,11- se metabolismus odvíjel oxygenací míst 1,2-, 5,6-, a 7,12-. Tímto se rod *Mycobacterium* liší od *S. yanoikuyae*, která oxidovala BaA preferenčně v pozici 1,2-, méně v pozicích 8,9- a 10,11- (Jerina *et al.*, 1984).

Po ataku CHD na 5,6- pozici vzniká *cis*-5,6-dihydrodiol, ten je dále transformován na 5,6-dihydroxybenzo[a]anthracen a orto-štěpením přechází na 3-(2-karboxyfenyl)-2-naftoovou kyselinu. Další popsanou možností degradace BaA je dráha ústící v benz[a]anthracen-7,12-dion, který je dále transformován na 1-(2-hydroxybenzoyl)-2-naftoovou kyselinu a nakonec na 1-benzoyl-2-naftoovou kyselinu.

Atak na 1,2- pozici formuje benz[a]anthracen-*cis*-1,2-dihydrodiol, ten podléhá dehydrogenaci za vzniku 1,2-dihydroxybenz[a]anthracenu, který je štěpen na 1,2-dihydroxyanthracen. Další reakce tohoto intermediátu by mohly vést až k detekovanému produktu benzo[g]chromen-2-onu, který nejspíš podléhá dalším oxidacím a štěpení.

Dráha, která *M. vanbaalenii* nejvíce dominovala, byla navržena jako oxidace a štěpení v pozici 10,11-. Probíhá přes benz[a]anthracen-*cis*-10,11-dihydrodiol, posléze dochází k obnově aromatického kruhu na dihydroxylovaný intermediát. Ten podléhá *o*-metylacím za vzniku 10,11-dimethoxybenz[a]anthracenu nebo meta-štěpení cyklu, to pravděpodobně vede k jeho opětovnému uzavření a vytvoření nafto[2,1-*g*]chromen-10-onu. Jak je patrné, enzymatická výbava *M. vanbaalenii* a dalších bakterií z této skupiny skýtá velký potenciál pro remediace půd znečištěných potenciálně genotoxickými těžkými PAU.

Jouanneau a kolektiv navrhli dráhu začínající dioxygenací pozic 10,11- a 1,2- stejně jako Moody a kolektiv a identifikovali intermediát 8,9-*cis*-dihydrodiol náležící do dráhy obdobného ataku (Jouanneau *et al.*, 2006). Tuto degradaci prováděla *Sphingomonas sp.* CHY-1 dioxygenázou PhnI.



**Obrázek 5: Dráhy katabolismu benz[a]anthracenu *M. vanbaalenii*.** Sloučeniny v závorkách znázorňují navržené, nikoliv detekované intermediáty. Upraveno dle Moody *et al.*, 2005.

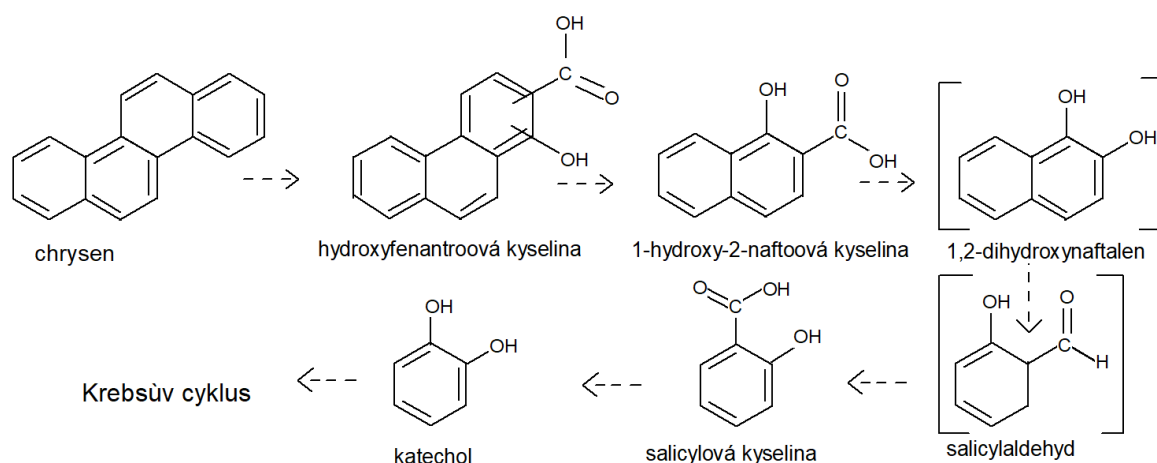
### 4.3 Chrysen

CHR je čtyřcyklý PAH také podezřelý z karcinogenních efektů. Zatím není známo mnoho případů, kdy by byl CHR subjektem kometabolismu nebo dokonce jediným zdrojem energie (Demanéche *et al.*, 2004). Krom těchto možností degradace byla dříve objevena přeměna chrysenu CHD *Sphingomonas sp.* CHY-1, která jej transformovala na *cis*-dihydrodiol (Lal *et al.*, 1996). Tato bakterie má tuto CHD s velmi dobře uzpůsobeným aktivním centrem pro těžké PAU. Až donedávna byla jediným známým metabolitem CHR *o*-hydroxyfenanthroová kyselina, to změnili Nayak a kolektiv navržením drah katabolismu CHR bakterie *Pseudoxanthomonas sp.* PNK-04 viz Obrázek 6 (M. Baboshin *et al.*, 2008; Nayak *et al.*, 2011).

Tato bakterie využívala CHR jako jediný zdroj energie a za 12 dní inkubace kleslo množství CHR o 60 % z původních 140 mg/l.

Kmen PNK-04 pravděpodobně začíná katabolismus CHR jako bylo navrženo Baboshinem a kolektivem, tedy transformací na hydroxyfenanthroovou kyselinu (C3). Ta podléhá dekarboxylaci, hydroxylaci, štěpení kruhu a další degradaci a poskytuje další detekovaný metabolit 1-hydroxy-2-naftoovou kyselinu (C2). Tento intermediát je dále konvertován 1-hydroxy-2-naftoát hydroxylázou na 1,2-dihydroxynaftalene, který podléhá degradaci enzymem 1,2-dihydroxynaftalen dioxygenázou na salicyladehyd a salicyladehyd dehydrogenázou na salicylovou kyselinu (C1). Salicylová kyselina je konvertována na katechol, ten je štěpen v orto poloze na *cis,cis*-mukonovou kyselinu katechol-1,2-dioxygenázou.

Krom tohoto kmene Jouanneau a kolektiv identifikovali 3,4-*cis*-dihydrodiol jako intermediát degradace CHR bakterií *Sphingomonas sp.* CHY-1. Také pozorovali opětovnou dioxygenaci tohoto intermediátu za vzniku 3,4,9,10-bis-*cis*-dihydrodiolu (Jouanneau *et al.*, 2006).



Obrázek 6: Katabolismus chrysenu. Upraveno dle Nayak *et al.*, 2011.

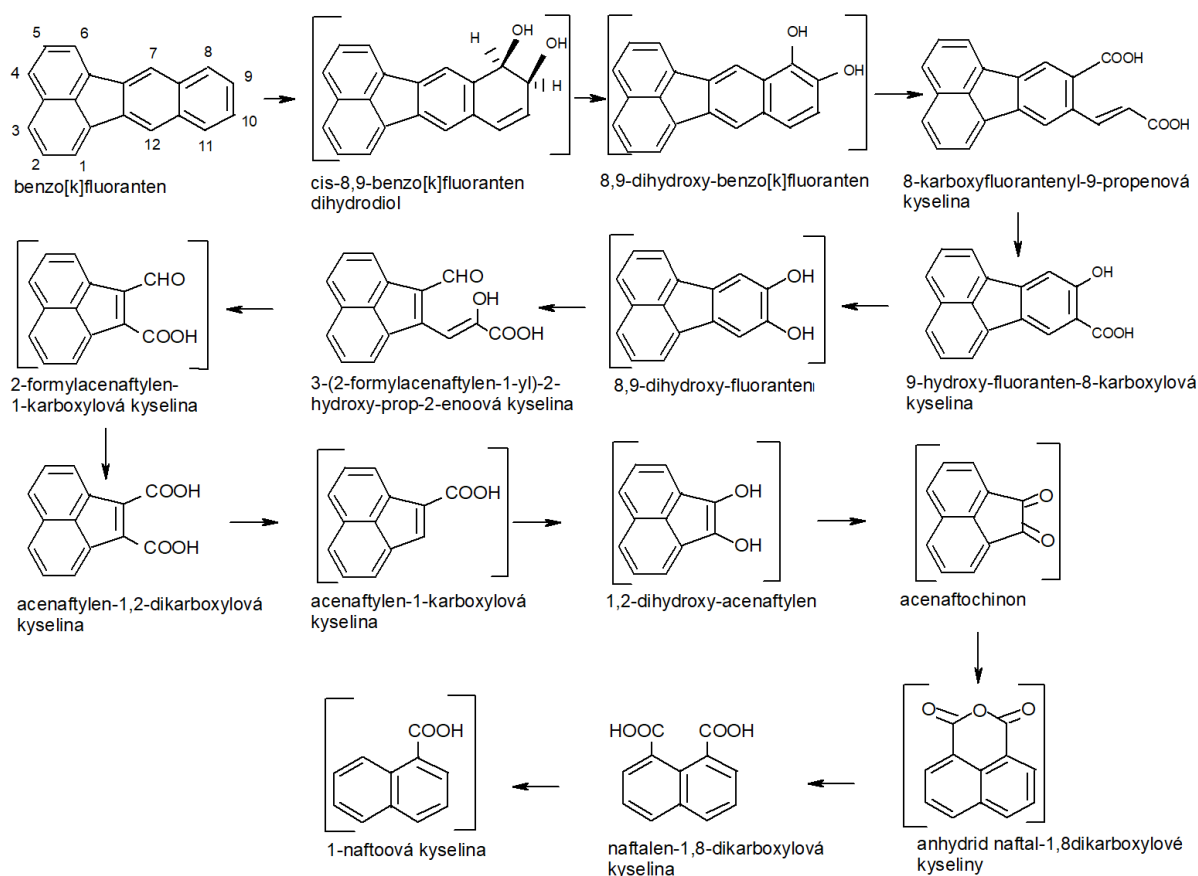
#### 4.4 Benzo[*b*]fluoranthen a benzo[*k*]fluoranthen

Jde o izomerické látky s chemickým vzorcem  $C_{20}H_{12}$  řazené jako pravděpodobné karcinogeny. Jeden z důkazů o degradaci BbF a BkF poskytli Ogbonna a kolektiv, když pozorovali úplnou absenci obou těchto látek z původních 25  $\mu\text{g/l}$  po 21 dnech inkubace s *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* a *Klebsiella sp.*, již po 14 dnech koncentrace těchto látek klesla na minimum (Oogbonna *et al.*, 2012).

Ačkoliv byl již dříve navržen možný intermediát degradace BkF, až Maeda a kolektiv podrobněji navrhli dráhu jeho metabolismu viz Obrázek 7 (Maeda *et al.*, 2014). *Sphingobium* kmen KK22 přeměnil BkF atakem na 8,9- pozici na odpovídající *cis*-8,9-benzo[*k*]fluoranthen

dihydrodiol a posléze 8,9-dihydroxy-benzo[*k*]fluoranthén. Tento útok je podobný prvnímu napadení 7,8- pozice fluoranthenu, který je také degradován stejnou bakterií. Následně dochází k orto-štěpení kruhu za vzniku 8-karboxyfluorantenyl-9-propenové kyseliny, dále odštěpení dvouuhlíkatého zbytku a k transformaci na 9-hydroxy-fluoranthén-8-karboxylovou kyselinu. Posléze vzniká 8,9-dihydroxyfluoranthén. Meta-štěpení ústí v 3-(2-formylacenaftýlen-1-yl)-2-hydroxy-prop-2-enovou kyselinu, ta přechází na 2-formylacenaftýlen-1-karboxylovou kyselinu, což je první společný intermediát dráhy BkF a fluoranthenu. Její aldehydová skupina je oxidována a vzniká acenaftýlen-1,2-dikarboxylová kyselina, dále acenaftýlen-1-karboxylová kyselina, 1,2-dihydroxy-acenaftýlen, acenaftochinon, anhydrid naftal-1,8-dikarboxylové kyseliny, naftalen-1,8-dikarboxylová kyselina a dalším štěpením 1-naftoová kyselina.

Benzo[*b*]fluoranthén je degradován i *Sphingomonas paucimobilis*, Story a kolektiv detekovali katabolické produkty Tn5 mutantů kmene EPA505 téže bakterie (Story *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 1996). Šlo často o konečné produkty metabolismu, hydroxyacefenanthroovou kyselinu, hydroxyacefenanthren u prvního mutantu, u druhého o otevřený kruh BbF a fenanthren anhydrid.



**Obrázek 7: Dráhy katabolismu benzo[*k*]fluoranthenu.** Upraveno dle Maeda *et al.*, 2014.

## 4.5 Indeno[1,2,3-*c,d*]pyren

Degradaci tohoto kontaminantu potvrdil Ogbonna a kolektiv po týdnu inkubace s *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* a *Klebsiella sp.* (Ogbonna *et al.*, 2012). Co se týče jednotlivých kmenů, je degradován také *S. paucimobilis* nebo *Pseudomonas taiwanensis* PYR1 a *Acinetobacter baumannii* INP1 (Huang *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 1996).

## 4.6 Dibenz[*a,h*]anthracen

Poslední těžkým PAU podezřelým z karcinogenity je DBA. Ačkoliv zatím není objasněn jeho metabolismus, byly zaznamenány případy degradace například *P. taiwanensis* PYR1, *A. baumannii* INP1 nebo *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003 (Huang *et al.*, 2016; A. Juhasz, Stanley, & Britz, 2002). Také byl prokázán růst *Burkholderia cepacia* kmene VUN 10 003 na DBA jako jediném zdroji uhlíku (Juhasz *et al.*, 1997).

# 5 Enzymy

## 5.1 Cyklus-hydroxylující dioxygenázy

CHD jsou z této dráhy prvními enzymy charakteristickými svou schopností degradovat kromě aromatických uhlovodíků i další kontaminanty. Můžou oxidovat i alkylbenzeny, chlorbenzeny, aromatické aminy, bifenylly a heterocyklické sloučeniny (Ang *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009; Pieper *et al.*, 2008).

Enzymy atakující substrát dvěma kyslíky tvoří rozsáhlou skupinu s různými sekvencemi i substrátovou specifitou, jeden organismus může nést geny pro více dioxygenáz. Například *M. vanbaalenii* kmen PYR-1 kóduje 21 hydroxylujících dioxygenáz s odchylkami v sekvenční identitě 28-59%, což ukazuje na značnou diverzitu substrátové specifity enzymů této bakterie (Kim *et al.*, 2008).

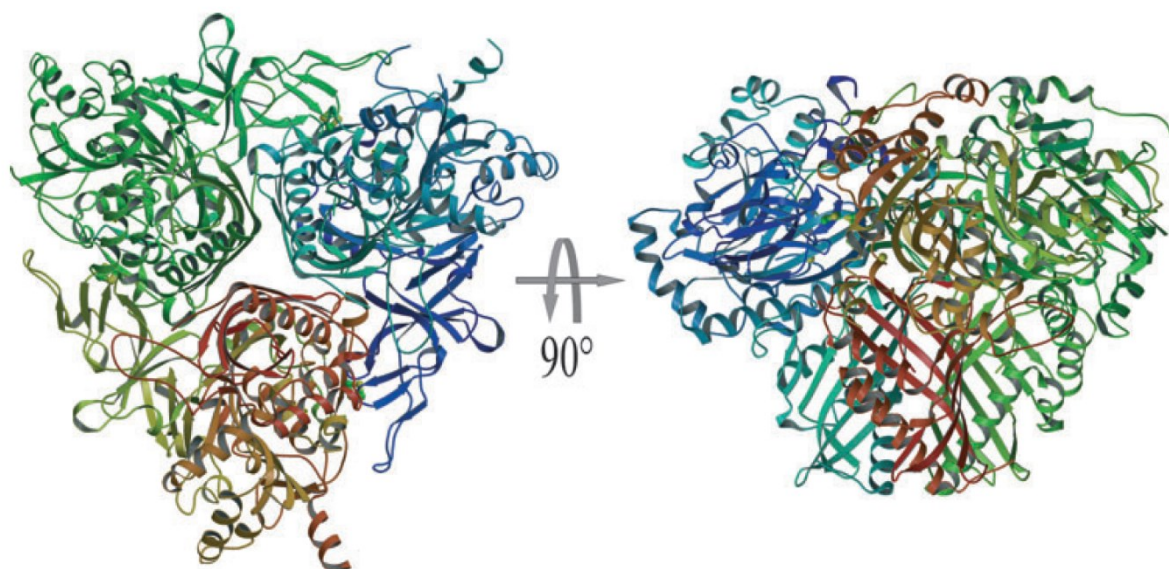
Tyto enzymy lze klasifikovat dle několika parametrů, dle struktury komponentů CHD systému, fylogeneticky nebo dle sekvencí aminokyselin (Kweon *et al.*, 2008). Posledním zmíněným způsobem je jejich příbuznost velmi podobná klasifikaci bakterií dle 16S rRNA podjednotky (Baboshin *et al.*, 2012).

Oxidace molekuly substrátu, v tomto případě PAU, dioxygenázami je ireverzibilní a zabraňuje difuzi PAU z buňky. Zatím nebyla prokázána negativní regulace dioxygenáz metabolismu systému, tato reakce tedy pravděpodobně určuje celý metabolismus PAU (Kacser *et al.*, 1995).



CHD jsou multikomponentní enzymy skládající se z reduktázy, ferredoxinu a oxygenázy. Flavoproteinová reduktáza oxiduje NADH na NAD<sup>+</sup>, elektron je předán ferredoxinem na Rieskeho centrum oxygenázy a konečně na atom železa. Redukovaná oxygenáza posléze oxiduje substrát (Jouanneau *et al.*, 2006). Oxygenázová podjednotka je sama homo či hetero-oligomer z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek a železa viz Obrázek 8. Toto železo je kromě okolních aminokyselin koordinováno i molekulou kyslíku. Samotná reakce CHD začíná atakem kyslíku na molekulu PAU a vzniká dihydroxylovaný intermediát.

Librando a kolektiv popsali interakci enzymu PhnI *Sphingomonas* CHY-1 s PAU (Librando *et al.*, 2011). Během této studie nezkoumali nejen  $\alpha$  podjednotku, ale celý komplex CHD a objevili síť kanálů propojujících aktivní místo enzymu s vnějškem a také dokovací místo, které by mohlo hrát roli v inhibici enzymu. Tato domněnka však zatím nebyla potvrzena.



**Obrázek 8: Krystalová struktura CHD PhnI.** Obrázek představuje dva úhly pohledu na dioxygenázu, ve kterých jsou tři  $\alpha$  podjednotky zobrazeny červeně, zeleně a modře,  $\beta$  podjednotky v odpovídajících světlejších tónech. Atomy železa žlutě a síry zeleně (Jakoncic *et al.*, 2007b; použito se svolením vydavatele).

### 5.1.1 Struktura $\alpha$ a $\beta$ podjednotky

CHD, nebo-li Rieske nehemová oxygenáza, je nejčastěji  $\alpha_3\beta_3$  heteromer, konkrétně hexamer. Tvoří hříbovitý tvar vysoký asi 75 Å se třemi  $\alpha$  podjednotkami jako klobouk a třemi  $\beta$  podjednotkami pod nimi, mezi trojicemi podjednotek nebyly zjištěny žádné rozdíly. Každá její  $\alpha$  podjednotka se sestává ze dvou domén, Rieske a katalytické domény. Rieske doména je složena ze tří  $\alpha$  helixů a jedenácti  $\beta$  listů ukrývajících na okraji domény 2Fe-2S centrum koordinované dvěma cysteiny a dvěma histidiny. Tato doména je propojena s iontem železa aktivního centra dalekosáhlou vodíkovou sítí mezi vysoce konzervovanými rezidui.



Katalytická doména zahrnuje 16  $\alpha$  helixů a 11  $\beta$  listů, je to právě struktura  $\beta$  listu, která odděluje aktivní místo enzymu od Rieske centra. Tento pomyslný most představuje kyselina asparagová, která je obklopena dvěma histidiny, jeden je ligand katalytického železa a druhý je ligandem Rieskeho centra. C konec  $\alpha$  podjednotky naopak plní nejspíš jen strukturní funkci, na rozdíl od sekvence hydrofobních aminokyselin v blízkosti centra enzymu, určující substrátovou specifitu a poskytující vhodné prostředí pro vazbu substrátu (Parales *et al.*, 1998).

Katalytické železo je koordinováno ještě molekulou kyslíku, která Van der Waalsovými silami interaguje s přítomným substrátem (Karlsson *et al.*, 2003). Při zaměnění kyseliny asparagové za jinou aminokyselinu dochází k inaktivaci celého enzymu. Kyselina asparagová se tedy pravděpodobně sama účastní přenosu elektronu anebo alespoň zprostředkovává spojení podjednotek a tak jeho přenos umožňuje. Těchto sedm výše zmíněných aminokyselinových reziduí je konzervovaných téměř ve všech CHD. Dalšími konzervovanými rezidui v blízkosti katalytického železa jsou dva glyciny, kyselina asparagová a asparagin, které jsou součástí vodíkové sítě obklopující centrum enzymu (Parales *et al.*, 2003; Parales *et al.*, 2000).

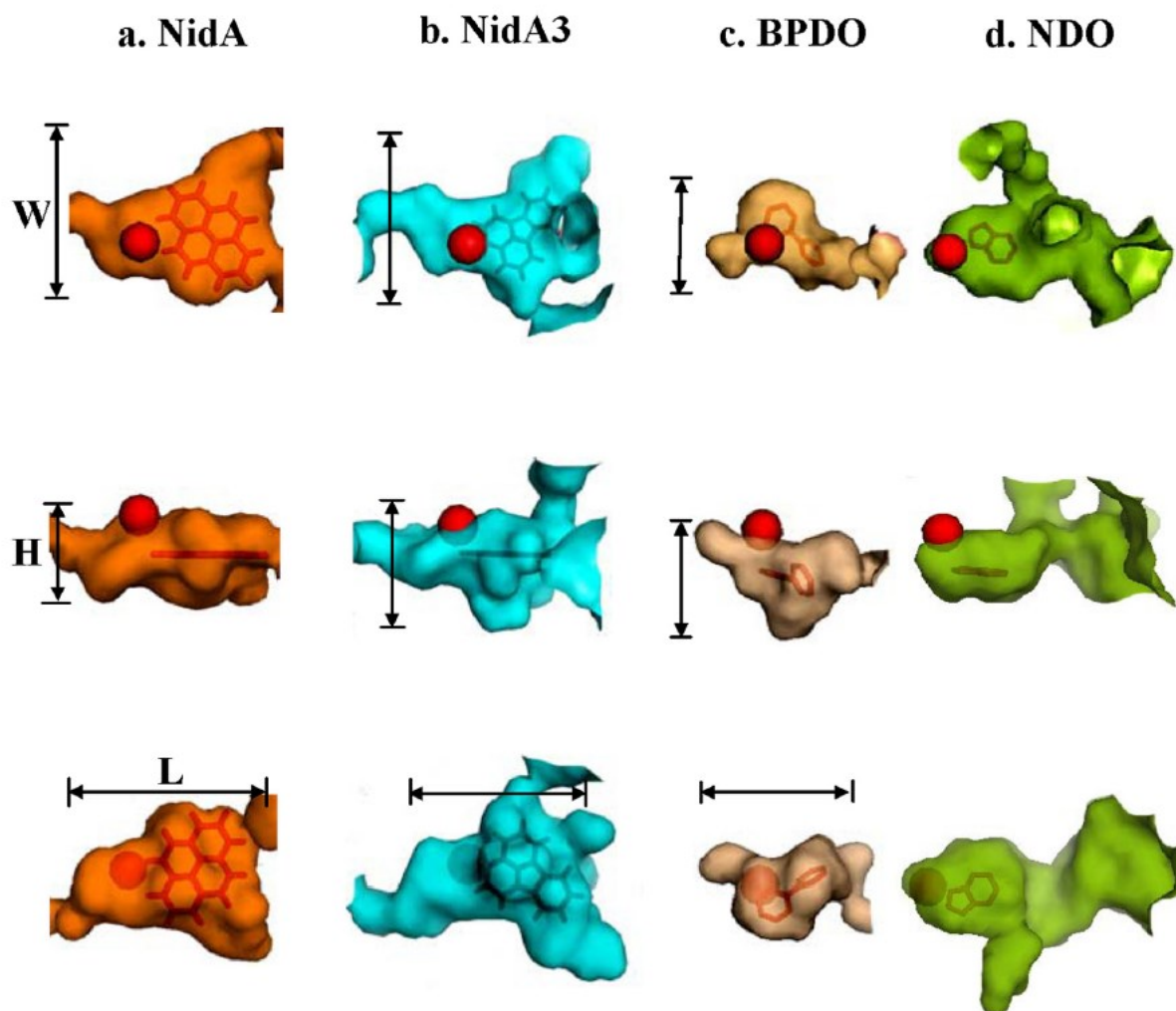
Funkce  $\beta$  podjednotky stále není zcela známa. Neobsahuje žádné prostetické skupiny a tedy se předpokládá, že plní pouze strukturní funkci. Jak krystalová struktura, tak aminokyselinová sekvence potvrzují tuto teorii.  $\beta$  podjednotka se nijak neúčastní aktivního centra enzymu a identita aminokyselinové sekvence  $\beta$  podjednotky příbuzných dioxygenáz také není příliš vysoká, na rozdíl od zachovaného strukturního vzoru a tvaru podjednotky.  $\beta$  podjednotky tvoří komínovitou strukturu, která má ve svém centru šesti vláknový  $\beta$  list obklopený  $\alpha$  helixy, krátkou coiled-coil strukturou a smyčkou. C konec s dalšími helixy utváří vstup do komína (Jakoncic *et al.*, 2007a).

### 5.1.2 Specifita aktivního místa

Již dříve byly izolovány dioxygenázy hydroxylující lehké PAU a odhaleny jejich krystalové struktury, dlouho ale nebyl znám enzym schopný oxidovat substráty o čtyřech a více cyklech (Parales *et al.*, 2000). Až Jounneau a kolektiv izolovali naftalen dioxygenázu z *Sphingomonas* CHY-1, která může atakovat i uhlovodíky o pěti cyklech (Jouanneau *et al.*, 2006). Dále byla purifikována a popsána dioxygenáza z *S. yanoukuyae* se schopností oxidovat těžké PAU (Ferraro *et al.*, 2007; Jakoncic *et al.*, 2007b).

Většina dioxygenáz schopná degradovat lehké PAU ovšem není přizpůsobena degradaci i těžkých PAU jako například dioxygenáza *Sphingomonas* sp. A4, která roste na acenaftenu, acenaftylenu, katalyzuje oxidaci naftalenu, fenathrenu, anthracenu a fluoranthenu, ale ne na čtyřcyklém uhlovodíku pyrenu (Pinyakong *et al.*, 2004).

Naopak obě CHD označené jako NidAB a NidA3B3 z bakterie *M. vanbaalenii* PYR-1 neaktivněji oxidují pyren a fluoroanthen, dále jiné těžké PAU a s nižší účinností lehké PAU. Dříve popsané CHD také mohou degradovat těžké PAU, ale čím více mají cyklů, tím se snižuje jejich specifita a potenciálně účinnost bioremediace. NidAB a NidA3B3 jsou těžkým PAU přizpůsobeny větší kavitou aktivního centra, schéma velikosti jejich kavit je představeno v Obrázek 9.

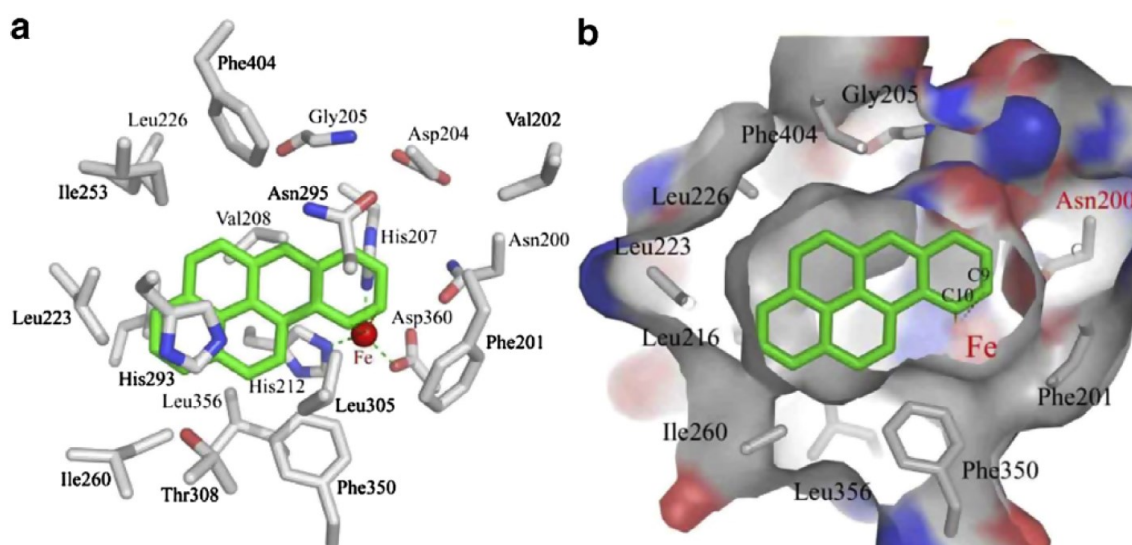


**Obrázek 9: Porovnání velikosti katalytických kavit Nid systémů s BPDO a NDO.** Oranžová BPDO představuje bifenylovou dioxygenázu, zelená NDO naftalenovou. Atom železa je reprezentován červenou tečkou (Kweon *et al.*, 2010; použito se svolením vydavatele).

Topologie aktivních center se dle Kweona a kolektivu mezi různými dioxygenázami a Nid systémy liší, rezidua důležitá pro funkčnost enzymu jsou však konzervována napříč systémy (Kweon *et al.*, 2010). Tato rezidua jsou již zmíněné dva histidiny a kyselina asparagová koordinující atom železa a nejspíš i prostorově konzervované fenylalaniny naznačují důležitost ve funkci enzymu (Ferraro *et al.*, 2005). Pravděpodobně umožňují vazbu substrátu poblíž iontu železa koordinujícího molekulu kyslíku a tak katalyzují přeměnu substrátu. U dioxygenázy

*Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 substituce těchto tří fenylalaninů zapříčinily neaktivitu enzymu, kdežto substituce na jiných místech aktivního nezpůsobily změnu v enzymatické aktivitě (Parales *et al.*, 2003; Parales *et al.*, 2000). Tato místa jsou u enzymů přizpůsobených degradaci těžkých PAU zachována, ačkoliv je kavita aktivního centra prodloužena aminokyselinami v jejím distálním centru, které zároveň kontrolují vstup substrátu do kavity.

Prodloužení distálního regionu katalytické kavity a tak přizpůsobení k degradaci těžkých PAU znovu popsali Jakoncic a kolektiv ve své další práci (Jakoncic *et al.* 2007a). Porovnali několik CHD včetně bifenyl dioxygenázy *Rhodococcus sp.* kmene RHA1, BPDO-O<sub>RHA-1</sub>, naftalen dioxygenázu NDO-O<sub>9816-4</sub> *Pseudomonas sp.* kmene 9816-4 a dioxygenázu PhnI *Sphingomonas* CHY-1. Poslední zmíněná CHD měla objem 91 Å<sup>3</sup>, tedy téměř o polovinu více než NDO-O<sub>9816-4</sub> s 65 Å<sup>3</sup> a dvakrát větší v porovnání s kavitou BPDO-O<sub>RHA-1</sub>. Zkoumané dioxygenázy včetně NDO-O<sub>9816-4</sub> obsahují ve smyčkách distálního regionu kavity fenylalanin a další větší rezidua, kdežto PhnI má na jejich pozicích 223 a 260 prostorově menší leuciny. Smyčky jsou také posunuté dále od kavity a zvětšují ji tak. Kromě tohoto zjištění také odhalili dva fenylalaniny na pozicích 350 a 404 určujících regio-specifitu reakce a produktu viz Obrázek 10.



**Obrázek 10:** Aktivní místo CHD PhnI s BaP vystaveno uhlíky 9 a 10 katalytickému železu. Rezidua vepředu jsou vyobrazena černě, rezidua v pozadí šedivě a substrát zeleně. Atom železa je reprezentován červenou tečkou (Jakoncic *et al.*, 2007a; použito se svolením vydavatele).

Roli v aktivitě přeměny látky u těchto enzymů hraje i struktura substrátu, upřednostňovány jsou planární molekuly jako pyren než například molekula BaA. Velikost kavity Nid systémů dává prostor pro různé vazebné módy zvláště u menších substrátů, které jsou v ní pohyblivé a tyto PAU nejsou enzymy přeměňovány na specifický produkt, ale poměrně nespecificky na

více možných produktů. Naopak pyren je přeměňován na konkrétní regiospecifický metabolit C-4,5 dioxygenací, která netvoří dále nedegradovatelné produkty, ale intermediáty napojeny na Krebsův cyklus (Kim *et al.*, 2007).

Přizpůsobení aktivního centra dioxygenázy lehkých PAU degradaci těžkých PAU je tedy patrně méně pravděpodobné než opačně.

Ačkoliv si nejsou CHD různých bakterií příliš podobné primárními strukturami, v terciárních vykazují vyšší identitu. Geometrie jejich aktivních míst se také může lišit a tudíž vykazují i různou substrátovou specifitu. CHD s nejvyšší specifitou je zřejmě naftalenová dioxygenáza *Pseudomonas sp.* NCIB 9816 konvertující kolem padesáti různých aromatických substrátů, ale ne těžkých PAU (Resnick *et al.*, 1996).

## 5.2 Dihydrodiolové dehydrogenázy

Druhým krokem horní dráhy metabolismu PAU je dehydrogenace dihydrodiolu na orto nebo meta dihydroxylovaný intermediát. Touto reakcí dochází k opětovné tvorbě aromatického kruhu a stabilizaci celé molekuly. Jak již bylo zmíněno dihydrodioly ochotně interagují s nukleovými kyselinami a proteiny. DD tedy hraje významnou roli v detoxifikaci buňky.

Jako dioxygenázy se i DD můžou v bakteriálním genomu vyskytovat ve více kopiích, v případě *M. vanbaalenii* PYR-1 Kim a kolektiv identifikovali pět jejích paralogů (Kim *et al.*, 2007, 2008).

## 5.3 Cyklus-štěpící dioxygenázy

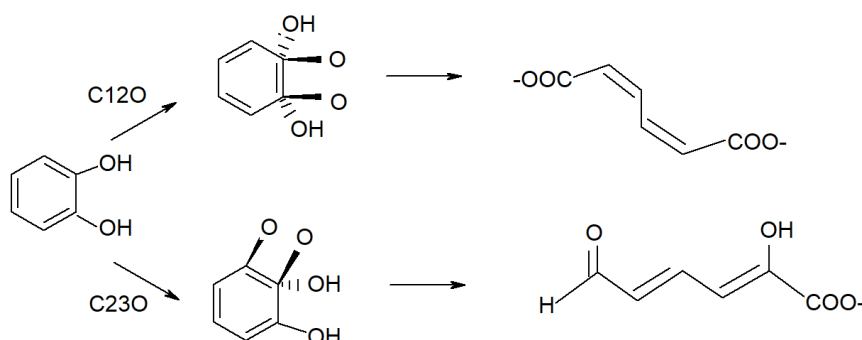
CŠD jsou druhým dioxygenázovým enzymem degradačních drah PAU, kromě jejich katabolismu se podobné enzymy vyskytují i v degradacích dalších aromatických i nearomatických kontaminantů a biosyntetických drahách. Existují tedy štěpící dioxygenázy katecholu, protokatechuátů, salicylátů, aromatických aminokyselin, 2-aminofenolů nebo hydrochinonů, z nichž první zmíněné jsou klíčové pro metabolismus PAU (Vaillancourt *et al.*, 2006).

Podobně jako CHD obsahuje katalytické železo a kyslík, tím ale znovu vzniklý aromatický kruh atakuje a štěpí. Jak již bylo výše zmíněno, můžeme je dělit do dvou skupin, intradiolových s  $\text{Fe}^{\text{III}}$  štěpících v orto poloze a extradiolových štěpících v meta poloze s  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Produktem orto-štěpení je *cis,cis*-mukonová kyselina, produktem meta-štěpení je semialdehyd 2-hydroxymukonové kyseliny viz Obrázek 11 (Harayama *et al.*, 1989).

Reakce probíhá interakcí hydroxylových skupin intermediátu s iontem železa, které krom aminokyselin koordinuje molekula kyslíku. V tento moment přichází elektron na molekulu kyslíku, dojde k vazbě mezi kyslíkem a uhlíkem, k vzniku druhé C-O vazby a rozštěpení molekuly.

Ačkoliv zatím nebyla objasněna struktura CŠD, která by štěpila produkty metabolismu těžkých PAU, několik prací se věnovalo zkoumání exprese CŠD za degradace těchto látek. Singh a kolektiv studovali expresi enzymů při růstu bakteriálního konzorcia na pyrenu a zaznamenali zvýšenou expresi katechol 1,2-dioxygenázy i katechol 2,3-dioxygenázy, ovšem u rozdílných bakterií. C12O je intradiolová dioxygenáza, kdežto C23O je extradiolová dioxygenáza, je tedy patrné, že různé bakteriální kmeny provádějí degradaci pyrenu různými cestami (Singh *et al.*, 2013).

Dhote a kolektiv prokázali, že degradace CHR jimi izolovanými kmeny Chry2 a Chry3 je prováděna především C23O, aktivita C12O oproti kontrole nevzrostla (Dhote *et al.*, 2010). Při degradaci BaP došlo jak u *Pseudomonas aeruginosa* PSA5, tak u *Rhodococcus sp.* NJ2 k indukci exprese C12O i C23O (Mishra *et al.*, 2014).



**Obrázek 11: Schéma štěpení štěpení v meta a orto poloze dioxygenázou.** Upraveno dle Bugg *et al.*, 2001.

## 6 Závěr

I přes důležitost odbourání PAU z životního prostředí stále nemáme dostatek poznatků k popsání mechanismů degradace PAU podezřelých z karcinogenity, ani neznáme enzymatické přizpůsobení většího počtu bakterií tomuto procesu. Toto ústí v toxické vlivy PAU na půdní a vodní ekosystémy i člověka.

V této studii jsem shrnula dráhy degradace těžkých PAU a strukturu enzymů, které tyto substráty transformují. Jelikož všechny zde podrobně rozebrané PAU (BaP, BaA, CHR, BbF, BkF, IcdP a DBA) jsou podezřelé několika světovými organizacemi z karcinogenních efektů, další výzkum v této oblasti a aplikace těchto informací v bioremediacích jsou klíčové.

*M. vanbaalenii* kromě dalších ne tak dobře prozkoumaných bakterií rozkládá BaP i BaA několika dráhami, především vedoucími přes CHD, minoritně přes cytochrom P450 monooxygenázu. Ani při jedné degradaci nebyla pozorována akumulace intermediátů s toxickými vlastnostmi. Naopak docházelo k rychlé přeměně obou látek na neškodné produkty.

*Sphingomonas sp.* CHY-1 je schopná dioxygenovat BaA i CHR, pokračování drah CHR ale zatím nebylo objasněno. Obě tyto bakterie se jeví jako vhodné pro bioremediační technologie a případně je možné využít znalostí o struktuře jejich katalytických kavit v upravení CHD jiných bakterií metodami genového inženýrství pro efektivnější degradace těžkých PAU.

Co se týče BbF a BkF, znám je pouze metabolismus BkF *Sphingobium* KK22, ačkoliv degradace BbF byla také pozorována a jeho dráha bude pravděpodobně velmi podobná dráze BkF.

Metabolismus ani intermediáty IcdP a DBA zatím nejsou známy a nabízí se tak možnost výzkumu na toto téma s využitím bakterií, jejichž degradační schopnosti byly na rozklad těchto látek již dříve uplatněny.

*M. vanbaalenii* a *Sphingomonas sp.* CHY-1 jsou dobře prostudované bakterie, obě přizpůsobené degradaci těžkých PAU. Katalytická kavita Nid systémů i dioxygenázy PhnI je významně větší než u ostatních dioxygenázových enzymů. Hlavní změny jsou pozorované v distálním regionu katalytické kavity, kde došlo ke změně polohy smyček a výměně prostorově větších reziduí za menší leuciny v případě PhnI.

Rozklad těžkých PAU není omezen pouze strukturou dioxygenázy. PAU o více cyklech jsou velmi lipofilní, špatně se rozpouští ve vodě a pro bakterie jsou hůře dostupné. Některé bakterie tuto překážku překonávají produkcí surfaktantů, které obklopují jednotlivé molekuly těžkých PAU, rozptýlí je a učiní je tak biodostupnějšími. Zatím nebyl nalezen žádný transportér přenášející PAU do buňky. Velikost těžkých PAU znesnadňuje jejich difúzi přes membránu a proto mohou být pro bakterie lehké PAU výhodnějším substrátem. K jejich degradaci také není potřeba kódovat a udržovat tak rozsáhlou enzymatickou výbavu jako pro těžké PAU.

Při aktivním přenosu do buňky stačí nízká vnější koncentrace PAU, pokud se jedná pouze o difúzi, průchod PAU přes membránu se snižuje úměrně jejich koncentraci v okolním prostředí. Od nižších koncentrací se bakteriím nevyplatí exprese enzymatické výbavy pro jejich degradaci. Tento fakt může představovat nevýhodu pro bakterie transformující jen těžké nebo lehké PAU, naopak výhodu bakteriím přizpůsobeným degradaci širokého spektra substrátů.

Obě popsané bakterie *M. vanbaalenii* a *Sphingomonas sp.* CHY-1 se jeví jako vhodné pro bioremediační technologie, ale vykazují dlouhé generační doby. Hledání jiných degradačních kmenů by měl být jedním z cílů dalšího výzkumu této oblasti. Možným zdrojem takovýchto

zatím neprozkoumaných bakteriálních kmenů by mohl být kompost. V minulosti jeho výzkumu bránila nekultivovatelnost bakterií, rozvoj sekvenačních technologií v posledních letech ale poskytuje řešení tohoto problému a potenciální cíl dalšího výzkumu.

Výzkum v této oblasti by se také mohl dále ubírat cestou genového inženýrství. Na základě poznatků o struktuře katalytických kavit *M. vanbaalenii* a *Sphingomonas* CHY-1 by mohly být provedeny úpravy již známých degradátorů. Vzhledem k dopadům těžkých PAU na životní prostředí a lidské zdraví můžeme očekávat velký rozvoj výzkumu v této oblasti.

## 7 Použitá literatura

- \*Alagić, S., Maluckov, B. S., & Radojičić, V. B. (2015). How can plants manage polycyclic aromatic hydrocarbons? May these effects represent a useful tool for an effective soil remediation? A review. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 17(3), 597–614. <https://doi.org/10.1007/s10098-014-0840-6>
- Andersson, B. E., & Henrysson, T. (1996). Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5–6), 647–652. <https://doi.org/10.1007/s002530050875>
- Ang, E. L., Obbard, J. P., & Zhao, H. (2009). Directed evolution of aniline dioxygenase for enhanced bioremediation of aromatic amines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(6), 1063–1070. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1710-0>
- Annweiler, E., Materna, A., Safinowski, M., Kappler, A., Richnow, H. H., Michaelis, W., & Meckenstock, R. U. (2000). Anaerobic Degradation of 2-Methylnaphthalene by a Sulfate-Reducing Enrichment Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5329–5333. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5329-5333.2000>
- \*Azike, J. E. (2009). A review of the history , epidemiology and treatment of squamous cell carcinoma of the scrotum. *Rare Tumors*, 1, 47–49. <https://doi.org/10.4081/rt.2009.e17>
- Baboshin, M. A., & Golovleva, L. A. (2012). Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects. *Microbiology*, 81(6), 639–650. <https://doi.org/10.1134/S0026261712060021>
- Baboshin, M., Akimov, V., Baskunov, B., Born, T. L., Khan, S. U., & Golovleva, L. (2008). Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. VKM B-2434. *Biodegradation*, 19(4), 567–576. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9162-2>
- Bergmann, F. D., Selesi, D., & Meckenstock, R. U. (2011). Identification of new enzymes potentially involved in anaerobic naphthalene degradation by the sulfate-reducing enrichment culture N47. *Archives of Microbiology*, 193(4), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0667-4>
- Boyd, D. R., Sharma, N. D., Belhocine, T., Malone, J. F., & Allen, C. C. R. (2006). Dioxygenase-catalysed dihydroxylation of arene cis -dihydrodiols and acetone derivatives : a new approach to the synthesis of enantiopure tetraoxygenated bioproducts from arenes. *Chem. Commun.*, 4934–4936. <https://doi.org/10.1039/b612191h>
- Braithwaite, E., Wu, X., & Wang, Z. (1998). Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts : involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis*, 19(7), 1239–1246.

- Brezna, B., Kweon, O., Stingley, R. L., Freeman, J. P., & Cerniglia, C. E. (2006). Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, 522–532. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0190-8>
- \*Bugg, T. D. H., & Lin, G. (2001). Solving the riddle of the intradiol and extradiol catechol dioxygenases: how do enzymes control hydroperoxide rearrangements? *Chemical Communications*, (11), 941–952. <https://doi.org/10.1039/b100484k>
- Campo, L., Rossella, F., Pavanello, S., Mielzynska, D., Siwinska, E., Kapka, L., Fustinoni, S. (2010). Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers, *192*, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.12.018>
- \*Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 331–338. <https://doi.org/10.1007/BF00129093>
- Cerniglia, C. E., Baalen, C. V., & Gibson, D. T. (1980). Metabolism of Naphthalene by the *Cyanobacterium*. *Journal of General Microbiology*, (1 980), 485–494.
- Clemente, A. R., Anazawa, T. A., & Durrant, L. R. (2001). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by soil fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 255–261. <https://doi.org/10.1007/s00128-002-0011-z>
- Crépineau, C., Rychen, G., Feidt, C., Le Roux, Y., Lichtfouse, E., & Laurent, F. (2003). Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4841–4845. <https://doi.org/10.1021/jf0210371>
- D. N, O., T. J. K., I., & M. I., N. (2012). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Associated Microbes from Abattoir Wastes in the Niger Delta, Nigeria. *Journal of Microbiology Research*, 2(6), 157–169. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20120206.02>
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: Role of biosurfactants in enhancing bioavailability. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 195–203. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03070.x>
- \*Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Demanèche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J. C., & Jouanneau, Y. (2004). Identification and Functional Analysis of Two Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxygenases from a *Sphingomonas* Strain That Degrades Various Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6714–6725. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6714>
- Desai, A. M., Autenrieth, R. L., Dimitriou-Christidis, P., & McDonald, T. J. (2008). Biodegradation kinetics of select polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures by *Sphingomonas paucimobilis* EPA505. *Biodegradation*, 19(2), 223–233. <https://doi.org/10.1007/s10532-0079129-3>
- \*Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(1), 47–64. [https://doi.org/10.1016/S0140-6701\(97\)84559-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6701(97)84559-6)
- Dhote, M., Juwarkar, A., Kumar, A., Kanade, G. S., & Chakrabarti, T. (2010). Biodegradation of chrysene by the bacterial strains isolated from oily sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 329–335. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0180-6>
- Doong, R., & Lin, Y. (2004). Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. *Water Research*, 38, 1733–1744. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.042>



- \*Dorantes, A. R., Angélica, L., & Zúñiga, G. (2012). Phenoloxidases activity in root system and their importance in the phytoremediation of organic contaminants. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 4(3), 35–40. <https://doi.org/10.5897/JECE11.012x>
- \*Durairaj, P., Hur, J. S., & Yun, H. (2016). Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0523-6>
- Eskandary, S., Tahmourespour, A., Hoodaji, M., & Abdollahi, A. (2017). The synergistic use of plant and isolated bacteria to clean up polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40201-017-0274-2>
- Ferraro, D. J., Brown, E. N., Yu, C. L., Parales, R. E., Gibson, D. T., & Ramaswamy, S. (2007). Structural investigations of the ferredoxin and terminal oxygenase components of the biphenyl 2,3-dioxygenase from *Sphingobium yanoikuyae* B1. *BMC Structural Biology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-10>
- \*Ferraro, D. J., Gakhar, L., & Ramaswamy, S. (2005). Rieske business: Structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 175–190. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.222>
- Garcia-Flores, E., Wakida, F. T., Rodríguez-Mendivil, D. D., & Espinoza-Gomez, H. (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Road-Deposited Sediments and Roadside Soil in Tijuana, Mexico. *Soil and Sediment Contamination*, 25(2), 223–239. <https://doi.org/10.1080/15320383.2016.1113497>
- García de Llasera, M. P., Olmos-Espejel, J. de J., Díaz-Flores, G., & Montañón-Montiel, A. (2016). Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3365–3375. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5576-2>
- Gibson, D., Mahadevan, V., Jerina, D., Yogi, H., & Yeh, H. (1975). Oxidation of the carcinogens benzo [a] pyrene and benzo [a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, 189(4199), 295–297. <https://doi.org/10.1126/science.1145203>
- Gibson, D. T. (1999). *Beijerinckia* sp strain B1: a strain by any other name. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23(4–5), 284–293. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/2900715>
- Harayama, S., & Rekik, M. (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *Journal of Biological Chemistry*, 264(26), 15328–15333.
- Huang, R. Ying, Tian, W. Jun, Liu, Q., Yu, H. Bo, Jin, X., Zhao, Y. Guo, Feng, G. (2016). Enhanced biodegradation of pyrene and indeno(1,2,3-cd)pyrene using bacteria immobilized in cinder beads in estuarine wetlands. *Marine Pollution Bulletin*, 102(1), 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.044>
- \*Chang, B. ., Shiung, L. ., & Yuan, S. . (2002). Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, 48(7), 717–724. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00151-0)
- Chen, B. H., & Lin, Y. S. (1997). Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Processing of Duck Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1394–1403. <https://doi.org/10.1021/jf9606363>
- Chen, S., & Aitken, M. D. (1999). Salicylate Stimulates the Degradation of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ. Sci. Technol.*, (919), 435–439.
- Ikenaka, Y., Sakamoto, M., Nagata, T., & Takahashi, H. (2013). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons ( PAHs ) on an aquatic ecosystem : acute toxicity and community-level toxic impact

- tests of benzo [ a ] pyrene using lake zooplankton community. *The Journal of Toxicological Sciences*, 38(1), 131–136.
- Jakoncic, J., Jouanneau, Y., Meyer, C., & Stojanoff, V. (2007a). The catalytic pocket of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(4), 861–866. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.117>
- Jakoncic, J., Jouanneau, Y., Meyer, C., & Stojanoff, V. (2007b). The crystal structure of the ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1. *FEBS Journal*, 274(10), 2470–2481. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05783.x>
- Jerina, D. M., Van Bladeren, P. J., Yagi, H., Gibson, D. T., Mahadevan, V., Neese, A. S., ... Boyd, D. R. (1984). Synthesis and absolute configuration of the bacterial cis-1,2-, cis-8,9-, and cis-10,11-dihydro diol metabolites of benz[a]anthracene formed by strain of *Beijerinckia*. *The Journal of Organic Chemistry*, 49(19), 3621–3628. <https://doi.org/10.1021/jo00193a033>
- Jiang, X. W., Liu, H., Xu, Y., Wang, S. J., Leak, D. J., & Zhou, N. Y. (2009). Genetic and biochemical analyses of chlorobenzene degradation gene clusters in *Pandoraea* sp. strain MCB032. *Archives of Microbiology*, 191(6), 485–492. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0476-9>
- Jin, X., Tian, W., Liu, Q., Qiao, K., Zhao, J., & Gong, X. (2017). Biodegradation of the benzo [ a ] pyrene-contaminated sediment of the Jiaozhou Bay wetland using *Pseudomonas* sp . immobilization. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1–2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.001>
- Jouanneau, Y., Meyer, C., Jakoncic, J., Stojanoff, V., & Gaillard, J. (2006). Characterization of a naphthalene dioxygenase endowed with an exceptionally broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochemistry*, 45(40), 12380–12391. <https://doi.org/10.1021/bi0611311>
- Juhasz, A. L., Britz, M. L., & Stanley, G. A. (1997). Degradation of fluoranthene, pyrene, benz [a] anthracene and dibenz [a,h] anthracene by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Microbiology*, 83(2), 189–198. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00220.x>
- Juhasz, A., Stanley, G., & Britz, M. (2002). Metabolite repression inhibits degradation of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 88–96. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000216>
- \*Kacser, H., Burns, J. A., Kacser, H., & Fell, D. A. (1995). The control of flux. *Biochemical Society Transactions*, 23(2), 341–366. <https://doi.org/10.1042/bst0230341>
- Karlsson, A., Parales, J. V., Parales, R. E., Gibson, D. T., Eklund, H., & Ramaswamy, S. (2003). Crystal structure of naphthalene dioxygenase: Side-on binding of dioxygen to iron. *Science*, 299(5609), 1039–1042. <https://doi.org/10.1126/science.1078020>
- \*Kim, K., Ara, S., Kabir, E., & Brown, R. J. C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons ( PAHs ) and their human health effects. *Environment International*, 60, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
- Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Edmondson, R. D., & Cerniglia, C. E. (2008). Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation*, 19(6), 859–881. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9189-z>
- Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P., Edmondson, R. D., & Cerniglia, C. E. (2007). Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 464–472. <https://doi.org/10.1128/JB.01310-06>
- Korfmacher, W. A., Wehry, E. L., Mamantov, G., & Natusch, D. F. S. (1980). Resistance to

- photochemical decomposition of polycyclic aromatic hydrocarbons vapor-adsorbed on coal fly ash. *Environmental Science and Technology*, 14(9), 1094–1099. <https://doi.org/10.1021/es60169a019>
- Kukučka, P., Lammel, G., Dvorská, A., Klánová, J., Möller, A., & Fries, E. (2010). Contamination of Antarctic snow by polycyclic aromatic hydrocarbons dominated by combustion sources in the polar region. *Environmental Chemistry*, 7(6), 504. <https://doi.org/10.1071/EN10066>
- Kweon, O., Kim, S. J., Baek, S., Chae, J. C., Adjei, M. D., Baek, D. H., ... Cerniglia, C. E. (2008). A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochemistry*, 9(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-11>
- Kweon, O., Kim, S. J., Freeman, J. P., Song, J., Baek, S., & Cerniglia, C. E. (2010). Substrate specificity and structural characteristics of the novel Rieske nonheme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases NidAB and NidA3B3 from *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *mBio*, 1(2), 9–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00135-10>
- Lal, B., & Khanna, S. (1996). Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *Journal of Applied Microbiology*, 81(4), 355–362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb01926.x>
- Librando, V., & Pappalardo, M. (2011). Journal of Molecular Graphics and Modelling Computational study on the interaction of a ring-hydroxylating dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1 with PAHs. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 29(7), 915–919. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2011.03.001>
- Luo, Y. R., Kang, S. G., Kim, S.-J., Kim, M.-R., Li, N., Lee, J.-H., & Kwon, K. K. (2012). Genome Sequence of Benzo(a)pyrene-Degrading Bacterium *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1. *Journal of Bacteriology*, 194(4), 907–907. <https://doi.org/10.1128/JB.06476-11>
- Maeda, A. H., Nishi, S., Hatada, Y., Ozeki, Y., & Kanaly, R. A. (2014). Biotransformation of the high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) benzo[k]fluoranthene by *Sphingobium* sp. strain KK22 and identification of new products of non-alternant PAH biodegradation by liquid chromatography electrospray ionization. *Microbial Biotechnology*, 7(2), 114–129. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12102>
- Maldonado, C., & Bodineau, L. (1999). Column Processes of Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Northwestern Black Sea Water. *Environmental Science and Technology*, 2693–2702.
- \*Marco-Urrea, E., García-Romera, I., & Aranda, E. (2015). Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *New Biotechnology*, 32(6), 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.01.005>
- \*Meckenstock, R. U., & Mouttaki, H. (2011). Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.009>
- Mishra, S., & Singh, S. N. (2014). Biodegradation of benzo(a)pyrene mediated by catabolic enzymes of bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(6), 1571–1580. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0300-6>
- Miyata, N., Iwahori, K., Foght, J. M., & Gray, M. R. (2004). Saturable, Energy-Dependent Uptake of Phenanthrene in Aqueous Phase by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 363–369. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.363-369.2004>
- Moody, J. D., Freeman, J. P., & Cerniglia, C. E. (2005). Degradation of benz [ a ] anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 513–526.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Fu, P. P., & Cerniglia, C. E. (2004). Degradation of Benzo [ a ] pyrene by

- Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation*, 70(1), 340–345. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.340>
- Moursy, A. S., & Abdel-Shafy, H. I. (1983). Removal of hydrocarbons from Nile water. *Environment International*, 9(3), 165–171. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(83\)90034-X](https://doi.org/10.1016/0160-4120(83)90034-X)
- Mugica, V., Torres, M., Salinas, E., Gutierrez, M., & García, R. (2010). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Urban Atmosphere of Mexico City. *Air Pollution*, 75–99.
- Narro, M. L., Cerniglia, C. E., Baalen, C. V. A. N., & Gibson, D. T. (1992). Metabolism of Phenanthrene. *Metabolism Clinical And Experimental*, 58(4), 1351–1359.
- Nayak, A. S., Sanjeev Kumar, S., Santosh Kumar, M., Anjaneya, O., & Karegoudar, T. B. (2011). A catabolic pathway for the degradation of chrysene by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04. *FEMS Microbiology Letters*, 320(2), 128–134. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02301.x>
- Parales, R. E. (2003). The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 271–278. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0043-3>
- Parales, R. E., Emig, M. D., Lynch, N. A., & Gibson, D. T. (1998). Substrate specificities of hybrid naphthalene and 2,1-dinitrotoluene dioxygenase enzyme systems. *Journal of Bacteriology*, 180(9), 2337–2344.
- Parales, R. E., Lee, K., Resnick, S. M., Jiang, H., Lessner, D. J., & Gibson, D. T. (2000). Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: Effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *Journal of Bacteriology*, 182(6), 1641–1649. <https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1641-1649.2000>
- Patel, H., Gupte, A., & Gupte, S. (2009). Biodegradation of fluoranthene by basidiomycetes fungal isolate *pleurotus ostreatus* HP-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(3), 367–376. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8286-0>
- Peng, C., Wang, M., & Chen, W. (2016). Spatial Analysis of PAHs in Soils along an Urban-Suburban-Rural Gradient: Scale effect, distribution patterns, diffusion and influencing factors. *Scientific Reports*, 6(November), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep37185>
- \*Pieper, D. H., & Seeger, M. (2008). Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15(2–3), 121–138. <https://doi.org/10.1159/000121325>
- Pinyakong, O., Habe, H., Kouzuma, A., Nojiri, H., Yamane, H., & Omori, T. (2004). Isolation and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from acenaphthene and acenaphthylene degrading *Sphingomonas* sp. strain A4. *FEMS Microbiology Letters*, 238(2), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.048>
- Qin, W., Zhu, Y., Fan, F., Wang, Y., Liu, X., Ding, A., & Dou, J. (2017). Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: Degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, 121, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.02.001>
- \*Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, P., & Nishigaki, I. (2015). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(3), 182–189. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30003-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30003-4)
- Rentz, J. A., Alvarez, P. J. J., & Schnoor, J. L. (2008). Benzo [ a ] pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environmental Pollution*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.02.018>
- Resnick, S., Lee, K., & Gibson, D. (1996). *Pseudomonas* sp strain NCIB 9816. *Journal of Industrial Microbiology*, 4(17), 438–457. [https://doi.org/gy 0169-4146/96/\\$12.0](https://doi.org/gy 0169-4146/96/$12.0)
- Romero, M. C., Cazau, M. C., Giorgieri, S., & Arambarri, A. M. (1998). Phenanthrene degradation by

- microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollution*, 101(3), 355–359. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00056-6)
- Rothermich, M. M., Hayes, L. A., & Lovley, D. R. (2002). Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbor sediment. *Environmental Science and Technology*, 36(22), 4811–4817. <https://doi.org/10.1021/es0200241>
- Selesi, D., & Meckenstock, R. U. (2009). Anaerobic degradation of the aromatic hydrocarbon biphenyl by a sulfate-reducing enrichment culture. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 86–93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00652.x>
- Sho, M., Hamel, C., & Greer, C. W. (2004). Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp . strain S65. *FEMS Microbiology Ecology*, 48, 209–220. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.01.011>
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., & Warshawsky, D. (1996). Degradation of Pyrene , Benz [ a ] anthracene , and Benzo [ a ] pyrene by *Mycobacterium* sp . Strain RJGII-135 , Isolated from a Former Coal Gasification Site. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 13–19.
- Schuler, L., Jouanneau, Y., Chadhain, S. M. N., Meyer, C., Pouli, M., Zylstra, G. J., Agathos, S. N. (2009). Characterization of a ring-hydroxylating dioxygenase from phenanthrene-degrading *Sphingomonas* sp . strain LH128 able to oxidize benz [ a ] anthracene. *Appl Microbiol Biotechnol* 465–475. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1858-2>
- \*Sikkema, J., de Bont, J. A., & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*, 59(2), 201–222. <https://doi.org/10.1128/mr.59.2.201-222.1995>
- Singh, S. N., Kumari, B., Upadhyay, S. K., Mishra, S., & Kumar, D. (2013). Bacterial degradation of pyrene in minimal salt medium mediated by catechol dioxygenases: Enzyme purification and molecular size determination. *Bioresource Technology*, 133, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.068>
- Story, S. P., Kline, E. L., Hughes, T. A., Riley, M. B., & Hayasaka, S. S. (2004). Degradation of Aromatic Hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis* Strain EPA505. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2), 168–176. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-3069-2>
- \*Tortella, G. R., Diez, M. C., & Durán, N. (2005). Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(4), 197–212. <https://doi.org/10.1080/10408410500304066>
- \*Vaillancourt, F., Bolin, J., & Eltis, L. (2006). The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4), 241–267. <https://doi.org/10.1080/10409230600817422>
- Vane, C. H., Rawlins, B. G., Kim, A. W., Moss-hayes, V., Kendrick, C. P., & Leng, M. J. (2013). Science of the Total Environment Sedimentary transport and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons ( PAH ) from managed burning of moorland vegetation on a blanket peat , South Yorkshire , UK. *Science of the Total Environment*, 449, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.043>
- Warshawsky, D., Radike, M., Jayasimhulu, K., & Cody, T. (1988). Metabolism of benzo(a)pyrene by a dioxygenase enzyme system of the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152(2), 540–544. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80071-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80071-8)
- Wei, S., & Pan, S. (2010). Phytoremediation for soils contaminated by phenanthrene and pyrene with multiple plant species. *Journal of Soils and Sediments*, 10(5), 886–894. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0216-4>

- Yamagiwa, K., & Ichikawa, K. (1917). Experimental study of the pathogenesis of carcinoma1. The Journal of Cancer Research, *111*(1).
- Yao, J., Huang, Z., & Masten, S. J. (1998). The ozonation of benz[a]anthracene: Pathway and product identification. *Wat. Res.*, *32*(11), 3235–3244.
- Ye, D., Akmal Siddiqi, M., Maccubbin, A. E., Kumar, S., & Sikka, H. C. (1996). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental Science and Technology*, *30*(1), 136–142. <https://doi.org/10.1021/es9501878>
- Zhou, J. L., & Maskaoui, K. (2003). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay , China. *Environmental Pollution*, *121*, 269–281.

Sekundární citace označeny \*.